

19. エイズ研究センター

センター長 山本直樹

概要

2006 年末現在、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者とエイズ患者の数は、全世界で累積 6000 万人にもおよぶと言われる。このうち、サハラ砂漠以南のアフリカ諸国が、約半数を占め、圧倒的に多い。しかし新たな感染地域として、エイズ/HIV の魔の手は次第にアジアにも及んできた。中国やインドの状況は空恐ろしささえ感じる。我が国でも 2006 年度は感染者の数が過去最高、しかも 3 年連続で 1,000 人を超えるなど、過去最高の新規感染者数を記録し、今後の感染拡大は大いに憂慮すべき状況である。

平成 11 年 10 月にいわゆるエイズ予防指針が策定され、わが国のエイズ対策の抜本的見直しと新方針が打ち出された。爾来、当センターはわが国のエイズ対策研究のための中核としての役割を果たしてきた。活動は大きく、施策的なものとワクチン開発や HIV 感染症の特効薬開発という研究要素の強いものに分けられるが、いずれもわが国における HIV 感染者やエイズ患者の QOL の向上、新規感染拡大の防止を第一の、そしてその成果を国際誌上で発信することで世界のエイズ、HIV 問題に貢献することを大きな目標に置いてきた。

HIV の感染予防研究に関しては、とくに BCG 及びワクシニア DIs ウイルスを用いた prime/boost ワクチン、これらに加え、ユニークな糖鎖変異ウイルスによる生ワクチンの臨床応用の可能性を強力に探っている。また HIV の多様性に対応可能な中和抗体の誘導の研究さらには種々のアジュバントを用いた粘膜免疫の誘導の研究に力を傾注している。一方、治療の面からは、HAART の効果には目覚ましいものがあり、感染者に大きな希望を与えている。しかし、そのコスト、慢性毒性、さらには薬剤耐性の獲得による治療困難症例の増加が大きな問題となっている。さらに HAART をもってしても、体内からウイルスを完全に駆逐することは今のところ不可能であり、感染予防のためのワクチン研究とともに、感染固体からのその根絶に向けた研究も重要である。このため今までにないような作用機序、とくに宿主因子を標的とした新たな抗 HIV 薬の開発が待望されている。一方、アジア、とくに中国やインドが AIDS/HIV の感染拡大において中

心の場となりつつある現状で、すでに高い評価を受けている当センターのアジアの分子疫学研究を推し進めてきた。

HIV 感染及び診断検査については、方法の標準化とその精度管理において、これまでどおりわが国の中心的役割を果たすことになる。また、感染者の治療については、直接あるいは間接的に感染者に還元できるような研究を推進している。その大きな柱の一つとして HAART を受けている患者の薬剤耐性のモニターがあり、それとともに耐性を出させない治療法についても研究を行っている。

当センターはまた、国際協力機構 (JICA) のアジアやアフリカにおけるエイズプロジェクト等にも積極的に協力してきた。また、JICA との協力によりアジア、アフリカ諸国等からの研修員を対象に HIV 診断技術講習を実施しており、多数の研修員を指導してきた。このように、当センターの活動は一層国際的な展開をみせている。一方、厚生労働省、文部科学省、HS 財団等の研究費による班研究等にも多数参加しており、我が国エイズ研究の中核となっている。

人事異動では、松田善衛第 3 室長が辞職 (平成 18 年 10 月 31 日付) し、そのあとを受けて村上努主任研究官が室長に昇任 (平成 19 年 2 月 1 日付) した。

当センターの運営に当たっては宮村達男所長、渡邊治雄副所長、佐多徹太郎感染病理部長、岡部信彦感染症情報センター長、山口一成血液・安全性研究部長、佐藤裕徳病原性ゲノム解析研究センター第 2 室長、寺尾恵治前および保富康宏新医薬基盤研究所所長類医科学研究センター長等多くの方の協力を得た。

研究の場に関しては第 3 室の村山から戸山への移転などで多少の改善がみられたものの、研究スペースの確保と統合は依然として悲願のままいまだ達成されておらず、最重要課題のひとつとなっている。

業績

調査・研究

I. エイズワクチンの開発

1. BCG/DIs プライムブーストワクチン

(1) プライミング抗原としての組み換え BCG - 修飾型

HIV Env の構築と免疫誘導能

米国 NIH ワクチン開発センターベクターコア研究室 (Nabel 所長) との共同研究で分与された HIV-1_{HXBc2} の Env-V3 領域を HIV-1_{BAL} のと入れ替えたキメラウイルスの Env-gp140ΔMFIΔV1,2 等の Env 修飾型遺伝子を BCG - Tokyo 株に組み込み、組み換え BCG (rBCG) を作成した。BALB/c マウスに 0.5mg 単回皮内接種し 8 - 9 週後の T 細胞反応を、同じ遺伝子を組み込んだプラスミッド DNA、50μg 三回筋注マウスと比較した。新しく開発した BAL-V3 特異的テトラマーを用いて CD8 陽性反応を比較すると、rBCG 免疫群は immunodominant な反応を示すテトラマーとは 0.3—0.5% の反応性を示すが、DNA 群では約 5 - 6% の CD8⁺T 細胞で陽性であった。従って BCG 免疫群のテトラマー活性は DNA 群と比較すると有意に弱い細胞内サイトカインの活性は広範に認められた。抗体産生能は BCG 群では極めてわずかであった。更に、同じ Env 遺伝子を組み込んだ組み換え Ad5 ウイルスを 10¹⁰PU 接種すると、細胞性免疫のみならず液性免疫の強い亢進が見られた。現在、BCG 免疫の特異性の解明と発現の改良を検討中である。

[本多三男、Gary J. Nabel(米国 NIH)、松尾和浩、兼清優、山本直樹]

(2) V3 改変型 HIV-1 Env 抗原の BCG での発現

組み換え BCG ワクチンの HIV-1 Env に対する免疫原性を改良するため、V3 ループの S-S 結合に近い位置のアミノ酸を部分的に欠失した gp140 遺伝子を *Mycobacterium kansasii* 由来 抗原遺伝子のプロモーターとシグナルペプチド遺伝子の下流に繋ぎ、BCG での発現を解析した。Env 抗原の菌体外への分泌は認められなかったが、菌体内での安定性が向上し、ほぼ全長の gp140 抗原を発現させることができた。Env 分泌発現の検討を継続して行う。

[松尾和浩、Gary J. Nabel(米国 NIH)、山本直樹、本多三男]

(3) コドン改変型 Gag 抗原遺伝子を発現する組み換え BCG の構築

コドンヒト型化した HIV-1 subtype B および SIVmac 由来 gag 遺伝子を米国 NIH より入手し、BCG での発現を検討した。以前に構築した CRF01_AE 由来 gag 発現株と同様に、BCG の hsp60 プロモーターに繋いで菌体内での発現を試みたが、組み換えプラスミッドが不安定で、発現株は得られなかった。そこで Env の場合と同様に 抗原遺伝子のプロモーターとシグナルペプチドの下流に繋ぎ BCG に導入したところ、ほぼ全長の Gag 抗原の高発

現が認められた。ワクチン研究センターで免疫誘導能を評価する。

[松尾和浩、Gary J. Nabel(米国 NIH)、山本直樹、本多三男]

(4) 低用量組換え BCG ワクチンの免疫誘導能に関する研究

これまでマウスあるいはサルを用いて BCG を担体とした HIV ワクチンの可能性について検討してきた。サルモデルにおいては BCG 自体に対する既存免疫が及ぼす影響についても検討し、組換え BCG 投与によって誘導される特異的免疫誘導を妨げないことを確認した。サルでは低容量の組換え BCG 単独投与によって誘導される特異的免疫応答は弱いものの、組換え BCG によるプライミングは組換えワクシニアウイルス DIs の追加免疫による免疫増強効果を著しく増幅することを明らかにした。このことから組換え BCG は特異的免疫記憶細胞を効率的に誘導し、長期にわたり維持された免疫記憶細胞は組換え DIs の追加免疫によって活性化され、抗 HIV/SIV 効果を発揮することが期待される。

[兼清優、網康至(動物管理室)、松尾和浩、染谷健二(ウイルス 3 部)、岡村智崇、須崎百合子(動物管理室)、吉野直人、山本直樹、本多三男]

(5) 結核菌の噴霧感染実験による BCG ワクチン効果の有効性、持続性の再評価

結核予防に用いられている現行の BCG ワクチンの加齢にともなう有効性を検討するため、BCG を再接種した壮年期、老年期モルモットに結核菌を噴霧感染し、BCG の結核菌防御能を調べた。BCG-Tokyo 172 株 0.5mg またはコントロールとして PBS を下腹部皮下に接種後、5 年間または 1 年間飼育した (それぞれ老年期群または壮年期群)。対照群として、新たに購入したモルモットを幼年期群とした。BCG あるいは PBS を再接種 (幼年期モルモットでは初回接種) 6 週間後に、BCG を接種した群で、ツベルクリン反応が陽性であることを確認した。その後、モルモット 1 匹当たり 10 個程度の結核菌 H37Rv 株の単個菌を噴霧感染装置で経気道的にエアロゾル噴霧感染した。感染 5 週後に全ての群でツベルクリン反応が陽性であることを確認後に剖検し、肺臓、脾臓、肝臓、気管リンパ節を摘出した。それぞれの臓器をストマッカー 80T 型 (オルガノ) を用いて均質化後、それらの滅菌精製水希釈液を 1% 小川培地に接種、37 °C で培養し、生じたコロニー数から臓器中の結核菌数を算定し結核菌防御能を検討した。また、ELISPOT 法を用い、細胞性免疫能

を検討した。解剖時の肉眼所見では、壮年期群は、BCG の再接種の有無に関係なく結核菌抑制効果が見られた。また、老年期群も BCG 再接種群で効果が認められた。還元培養でも同様に、老年期に BCG を再接種した場合に幼年期と同程度の結核菌の抑制傾向が見られた。ELISPOT 法においても、BCG を接種した壮年期群、老年期の細胞性免疫能が、幼年期群と同程度であることが確認できた。

[相澤志保子、服部真一郎、本多三男、山崎利雄(細菌 1 部)]

(6) 改変型 HIV Env 抗原分泌型組換え BCG のマウスでの免疫誘導能の解析

subtype B 由来の改変型 HIV Env gp140 あるいは gp145 を抗原とした抗原分泌型組換え BCG ワクチンを、皮下-皮下もしくは皮下-経口による同一ワクチンの prime-boost 投与方法によって BALB/c マウスに免疫し、血中の抗 HIV Env 抗体産生能を調べた結果、どの群においても boost による抗体価の上昇が確認された。本研究において、安全性の確立されている BCG をベクターとしたワクチンによる prime-boost の有効性を示唆している。[服部真一郎、松尾和浩、Gary J. Nabel(米国 NIH)、山本直樹、本多三男]

(7) 改変型 HIV Env 発現ワクシニア DIs による抗 HIV 免疫誘導について

我々は、安全性が極めて高いワクシニア DIs をワクチンベクターに用いて、Env の可変領域を至適化および gp41 を一部 truncate した改変型 Env (gp140ΔV1V2ΔCFI) を発現する組換え DIs (rDIs/ gp140ΔV1V2ΔCFI) を構築した。次に BALB/c マウスに 5 回接種し、血清 Env 抗体価、中和能および細胞性免疫を解析した。抗体価は、1024 ~ 2048 倍の抗体価が確認され、また HIV MN 株、JRCSF 株に対する中和反応が認められた。また Env ペプチドを用いた ELISPOT 法によって細胞性免疫が誘導されていることを確認した。

[岡村智崇、松尾和浩、杉山高啓、兼清優、堀端重男、染谷健二(ウイルス 3 部)、山本直樹、本多三男]

(8) HIV マルチエピトープ DIs ワクチンの開発

本研究は、ワクシニア DIs をワクチンベクターに用いて、2 つ以上の HIV 抗原を同時に発現する HIV ワクチンの開発を行った。抗原は、サルエイズモデルでの SHIV 攻撃接種を考慮して、SIVGag と HIVEnv を用いて構築し、Western blotting 法によって両抗原の発現を確認した。次

にマウスを用いた免疫実験を行ったところ、SIVGag および HIVEnv に対する抗体をそれぞれ確認された。また、両抗原に対する ELISPOT 法をそれぞれ行ったところ、細胞性免疫が強く誘導されていることも確認した。

[岡村智崇、服部真一郎、松尾和浩、染谷健二(ウイルス 3 部)、兼清優、堀端重男、山本直樹、本多三男]

2. 改良型 HIV env による中和抗体誘導型エイズワクチンの開発

HIV-1 に対する中和抗体の誘導を目的として、改良型 env 抗原を DNA ワクチン、DIs ワクチンでマウスに接種し、そのワクチン効果を評価した。本研究で使用した抗原は、Gary J. Nabel 氏より頂いた組換え env gp145dCFI と gp140dV1V2dCFI で、行ったワクチン接種は DNA ワクチンの単独接種と DNA/DIs ワクチンによる組み合わせワクチン接種である。まず、各ワクチンの抗原発現を *in vitro* で確認した後、精製した。実験は BALB/c マウスを使用し、DNA ワクチンの単独接種では、DNA ワクチンを 1 回あたり 50 μg/mouse で 3 週おきに 3 回接種後 4 週おきに 2 回の接種で計 5 回のワクチン接種を行った。DNA/DIs ワクチンでは DNA ワクチンを 1 回あたり 50 μg/mouse で 3 週おきに 3 回接種した後、DIs ワクチンを 1×10^6 PFU/mouse で 4 週おきに 2 回の接種で計 5 回のワクチン接種を行った。毎回ワクチン接種 1 週後の血清中の V3 特異的抗体の誘導を ELISA により評価した。ワクチン接種によって V3 特異的な免疫応答が誘導されたことを確認し、5 回のワクチン接種終了後、抗原特異的な IFN- の誘導を IFN- ELISPOT で、hIV-1 中和抗体の誘導を GHOST 細胞を用いたアッセイで評価した。

[高橋慎、千葉丈(東京理科大学)、Gary J. Nabel(米国 NIH)、本多三男]

3. 糖鎖欠失 SIV の heterologous SIV チャレンジ感染に対する生ワクチン効果

Env gp120 に 5 か所(aa79, 146, 171, 460, 479)の糖鎖欠失変異を導入した 5G はアカゲザルで感染制御され、さらに親株 SIV239 のチャレンジ感染をほぼ完全に制御する弱毒生ワクチンの性質を示すことをこれまでに報告した。さらに、5G と 1 か所の糖鎖欠失部位が異なる新たな 2 種の糖鎖欠失ウイルス、5G-v1(aa71, 79, 146, 460, 479)、5G-v2(aa79, 146, 377, 460, 479)を作製し、これらのウイルスはウイルス学的性質が異なるが、アカゲザルでの感染はいずれも 5G と同等に制御されることを昨年度までに明らかにした。これらの新規糖鎖欠失 SIV 感染ザルに強病原性 SIV 株をチャレンジ感染することにより、生

ワクチンとしての効果を検証した。まず、糖鎖欠失 SIV の親株である SIV239 のチャレンジ感染を試みた (homologous challenge)。その結果、新規糖鎖欠失 SIV 感染ザルも 5G 感染ザルと同様に、ほぼ完全に SIV239 感染を制御した。そこで次に SIV239 とアミノ酸レベルで 10~30%異なる SIVsm543-3 をチャレンジ感染することにより、heterologous virus に対する感染制御効果を検討した。5G、5G-v1、5G-v2 感染ザル各 2 頭に SIVsm543-3 を 1000TCID50 で静脈内接種した。その結果すべてのサルで peak viremia が 1000 分の 1 以下に制御された。2 頭については検出限界以下に制御された。すべての糖鎖欠失 SIV 感染ザルはチャレンジ感染前に接種した糖鎖欠失 SIV に対する中和抗体が誘導されていたが、これらの中和抗体は SIVsm543-3 を中和することはできず、チャレンジ感染後の中和抗体の上昇も見られなかった。このことから感染制御に中和抗体は関与しないと考えられる。今後はサルにおいて弱毒生ワクチンによる感染制御メカニズムを解明することにより、HIV 感染を効率よく制御できる方法を考えていきたい。

[杉本智恵、森一泰]

4. 糖鎖欠失ウイルスの初期感染の解析

サルにエイズを発症させる SIV239 と初期感染期のウイルス増殖は同等であるにもかかわらずその後の感染がきわめて低く制御される糖鎖欠失弱毒株 Δ5G のアカゲザルでの初期感染を病理学的に比較した。血中ウイルス量が同程度であった感染後 9 日目において、SIV239 感染ザルと Δ5G 感染ザルにおける初期感染の標的組織は腸管であると推定されたが、感染細胞の腸管組織内での局在が異なっていた。すなわち、SIV239 は免疫学的に inductive site として知られている孤立リンパ小節の CD4+T 細胞に、Δ5G は effector site として知られる粘膜固有層の CD4+ T 細胞に感染が認められた。また全身性リンパ組織である脾臓および表層ならびに深部リンパ節において、SIV239 感染ザルでは非常に多くの感染細胞が認められたのに対し、Δ5G 感染ザルではほとんど検出されなかった。末梢血リンパ球における感染細胞数も Δ5G 感染ザルでは SIV239 感染ザルより顕著に低かった。以上の結果から、初期感染は腸管の inductive site における感染と全身リンパ節への感染拡大が病原性と関連することが明らかになった。このことから、免疫メモリー細胞が存在する腸管 inductive site がウイルス感染によって傷害されることが免疫系の過剰な活性化や感染防御免疫の誘導の障害を引き起こすのではないかと考えられた。

[杉本智恵、森一泰]

5. 生ワクチンが誘導するエイズウイルス感染制御と関連する宿主応答の解析

弱毒ウイルス感染を制御した宿主には病原性ウイルスに対する極めて強い感染防御能が誘導されている。さらに感染防御能は MHC 等の宿主側因子の影響が少ないことからエイズワクチンに求められる条件を満たしている。我々は、弱毒 SIV (糖鎖欠失変異 SIV, nef 遺伝子欠損 SIV) 感染ザル以外にも病原性ウイルス感染に対しても感染後早期治療 (感染後 8 または 24 時間後から 4 週間の抗エイズ投与) により強い感染防御能が誘導されていることを明らかにした。これらの感染制御ザルがウイルス感染を防御する機序について解析を行った。中和抗体はワクチンが誘導する免疫のひとつであるがチャレンジウイルスに対する中和抗体は検出されなかった。細胞性免疫についてチャレンジ感染前後の SIV 特異的 CD4+T 細胞、CD8+T 細胞の頻度を IFN-gamma ELISPOT により調べた。チャレンジ感染により SIV 特異的 T 細胞は誘導され、特に Gag 特異的 CD4+T 細胞は多くの個体での誘導された。チャレンジ前後において同一エピートプに対する特異的 CD4+T 細胞の誘導も確認された。しかしこの細胞性免疫の誘導と感染制御との関係については今後の解析が必要である。

[杉本智恵、森一泰]

6. 粘膜免疫誘導アジュバントに関する研究

HIV ワクチン開発において粘膜免疫誘導が可能であれば、HIV の主な侵入門である生殖器粘膜での感染阻止が期待される。昨年度サルを用いた感染防御試験の検討で十分なデータが得られなかったため、再度各種アジュバント候補を OVA を抗原としてマウスでスクリーニングを行った。接種経路はこれまでの解析でもっとも効果的であった経鼻投与とした。その結果、低分子量キトサンおよびカチオン化キトサン等に高いアジュバント活性を認めた。さらに抗原を組換え HIV-1env タンパクを用いて同様にマウスで検討した結果、キトサン関連物質にアジュバント効果を認めた。現在、抗体の中和活性、キトサン関連物質の微細形態等を解析中である。

[石川晃一、小林丘(協力研究員)]

・ HIV 感染症の治療と薬剤耐性に関する研究

1. HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法(半日)の開発

昨年度までに開発した HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法の充実を図る。HIV 感染者血漿中の HIV-RT 薬剤感受性を測定し、薬剤耐性の新たな指標としての意義を明らかにする。以上の 2 点を目的として以下を検討した。まず、

これまで確認できなかった d4T-TP 耐性について新たな陽性対照変異株(K65R)を用意した。この株の薬剤感受性を本法で測定したところ、野生株と比較して 5.5 倍の耐性を確認した。これは培養法を用いた耐性度ともほぼ同等であることから、d4T-TP 耐性についても本法で検出可能であると判定した。次に昨年度までに測定した HIV 感染者血漿 8 検体の 3TC 感受性結果と臨床経過を照合したところ、約 1 ヶ月間隔で耐性度が 7.3 11.8 167.5 倍以上と推移した 1 症例を確認した。本症例では薬剤履歴と耐性度の相関が示唆されており、現在、詳細を解析中である。また 3TC 軽度耐性と判定された 3 症例は未治療であることが確認された。以上より、昨年度までに開発した HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法は AZT と 3TC に加えて d4T についても測定可能となり、充実が図られた。また薬剤履歴との相関も示唆される結果が得られたことから、薬剤耐性の新たな指標としての可能性も示唆された。本法では測定時間が半日(約 7 時間)で、培養を基本とした既存の測定法に比べて迅速である。また、既存の方法が血漿中ウイルスを選別してしまうのに対して、本法では総体として把握する事が可能である。今後、薬剤耐性の有用な指標と成り得るか、さらなる検討が必要である。[仲宗根正、西澤雅子、Walid Heneine (米国 CDC)、杉浦 互]

2. Allele-specific RT-PCR 法を用いた超高感度 HIV 薬剤耐性遺伝子定量法の開発

昨年度までに開発した HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法の課題のひとつに、遺伝子学的薬剤感受性(ゲノタイプ)と生物学的薬剤感受性(フェノタイプ)との相関が挙げられる。特に軽度耐性例の遺伝子学的薬剤耐性は、既存の方法は定性試験のため、詳しい相関について検討ができない。その弱点を補うべく、超高感度遺伝子学的薬剤耐性検査法開発に着手した。そのために、まず既報の手法の再現を試みるべく K103N 遺伝子を検出するための系を、続いて M184V 遺伝子検出系を作成した。その結果、予備実験において、既報と同等以上の background を確認した(0.0015%)。さらに、血漿中全ウイルス中に 0.15%以上存在する耐性遺伝子(K103N または M184V)であれば検出される可能性が示唆された。以上より、薬剤感受性のゲノタイプとフェノタイプとの相関解析のための準備が整った。今後、HIV-RT 薬剤感受性・耐性についての詳細な解析が可能になれば、それぞれの感染者に応じたきめの細かい治療法へとつながる事から、その意義は大きい。そのためにも、今後は系の精度管理とともに測定数を増やして、酵素学的耐性と遺伝子学的耐性の

定量的相関を明らかにすることが必要である。

[仲宗根正、西澤雅子、Sara Palmer (米国 NCI)、杉浦 互]

3. Recombinant-mannose binding lectin (r-MBL)の HIV 抑制効果の検討

HIV gp120 はマンノースを含む糖鎖で修飾された糖タンパクである。MBL 作用機序を考えると広範な HIV 株の複製抑制に寄与すると予想される。これまでの実験で MBL は多種類の HIV を *in vitro* の系で抑制した。しかし native MBL の大量作成は困難である為 *in vivo* での実用化は難しい。そこで native MBL と同等かもしくはそれ以上の抗 HIV-1 効果のあるリコンビナント MBL の同定を試みた。そこで 3 種類の MBL 産生クローン(M01-7F1, M01W08, 2-12)をそれぞれ種々の条件で培養したリコンビナント MBL を作成した。その結果 3 種のリコンビナント MBL はともに HIV に対する抑制活性が検出され、適切な培養条件が同定された。

[滝澤万里、若宮伸隆(旭川医大)、鈴木定彦(北海道大学)、岸雄一郎(扶桑薬品)、堀端重男、駒野淳、本多三男]

4. 抗 HIV-1 療法を受けている HIV/AIDS 患者の薬剤耐性モニタリング

我々は平成 8 年度より適切な抗 HIV-1 治療実現のための支援事業として、薬剤耐性 HIV-1 検査を実施している。薬剤耐性遺伝子検査の結果は約 3 週間で主治医に報告され、治療薬剤選択の指標として活用されている。平成 17 年度末までに参加した施設は 92 施設、解析を行った検体は平成 17 年 3 月の時点で累積 7396 検体、1659 症例に達している。平成 18 年度からは薬剤耐性遺伝子検査が保険収載されたため、検査は民間の検査会社にゆだねられることになり、我々のところで実施する検体は、精査を目的とするもの、経済的な理由により検査が困難なもの、そして次項に述べる疫学調査を目的としたものに限られるようになった。このため平成 18 年度の総検査数は 268 例と前年度の約 30%激減した。現在一番憂えていることは薬剤耐性検査の保険収載により抗 HIV 療法を受けている HIV/AIDS 集団における薬剤耐性 HIV の動向が把握できなくなったことであり、今後検査・調査体制の組みなおしが急務である。

[杉浦 互、三浦秀佳、千葉智子、西澤雅子、柿澤淳子、藤野真之、山本直樹、松田昌和(三菱化学メディエンス株式会社)]

5. 新規 HIV/AIDS 診断患者の動向調査

HAART が普及した今日、HIV/AIDS に新たに感染し、治療前にもかかわらず既に薬剤耐性を獲得している症例が世界各国で報告されており、その頻度は 10-20%ともいわれている。日本では新規 HIV 感染者数およびエイズ患者数報告数が年々記録を更新する勢いで増加しており、また治療を受けている患者数も増加を続けている。このことから本邦においても新規 HIV/AIDS 診断確定未治療患者への薬剤耐性 HIV の拡大が大きな関心をもたれている。我々は 2003 年から 2006 年にかけて全国の治療拠点病院、衛生研究所等の協力のもとに新規 HIV/AIDS 診断患者を対象に耐性検査を実施した。薬剤耐性検査ではプロテアーゼおよび逆転写酵素領域を、HIV サブタイプには *env* C2/V3 領域を RT-PCR にて増幅し、その配列解析を行った。対象症例は 03 年：267 例、04 年：307 例、05 年：429 例、06 年 395 例であった。いずれの年においても調査対象となった症例は 30-40 歳代の男性が中心で (>90%)、感染経路は同性間性的接触が 65-72%を占めていた。サブタイプは、いずれの年も 70%以上が B であり、次いで CRF_01AE であった。また少数ながらサブタイプ A、C、AG、G も観察された。薬剤耐性症例の頻度は 2003 年：4.5%、2004 年：4.2%、2005 年：4.5%、06 年 6.3%であった。クラス別に見るとヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤耐性の頻度は 03 年：3.4%、04 年：3.6%、05 年 2.6%、06 年 4.1%であった。非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤では 03 年：0.4%、04 年 1.0%、05 年 0.9%、06 年 0.8%、同プロテアーゼ阻害剤では 03 年：1.1%、04 年：0.3%、05 年：1.6%、06 年：1.5%であった。
[藤野真之、鈴木寿子、松田昌和(三菱化学メディエンス株式会社)、武田 哲、三浦秀佳、西澤雅子、山本直樹、杉浦 互]

6. 細胞内におけるプロテアーゼ阻害剤の薬剤濃度のモニタリング

薬剤感受性検査に用いられる HeLa 細胞のような非宿主細胞を基に樹立されたレポーター細胞の薬剤代謝が本来の宿主であるリンパ球と同等であるか明確ではない。本研究では細胞内の薬物濃度を HPLC を用いて測定し、細胞種による薬物動態の差について解析を行った。4 種類のプロテアーゼ阻害剤(PI)、ネルフィナビル(NFV)、サキナビル(SQV)、ロピナビル(LPV)そしてリトナビル(RTV)を各々1、2.5、5 及び 10 μ M で培養液中に添加して細胞を薬剤に曝露させた後、細胞を回収・破碎し PI を抽出し HPLC で PI を定量した。10 μ M の PI 濃度で比較した結果、NFV は HPB-M(a)と CEM の細胞内で約

100 倍、HeLa 細胞では約 200 倍に濃縮された。SQV は T 細胞系で約 70 倍、HeLa 細胞では約 200 倍であった。LPV は T 細胞系で約 10 倍、HeLa 細胞で約 40 倍であった。以上、細胞内 PI 濃度は NFV、SQV、LPV において HeLa 細胞の方が T 細胞系の細胞よりも高いことが示された。PI の細胞内への取り込みにおける温度の影響を HPB-M(a)と HeLa 細胞で解析した結果、HPB-M(a)では NFV と RTV は細胞内の PI 濃度は温度の影響を大きく受けなかったが、SQV では大きく阻害された。NFV の細胞内への取り込みの速度は 4 の条件下では 37 と比して有意に低下した。HeLa 細胞ではどの PI でも 4 の細胞内への取り込みは 37 の条件下よりも低かった。このように低温下で細胞内取り込みが阻害される PI はエネルギー依存的に細胞内へ取り込まれ、従来考えられていた拡散による細胞内取り込みとは異なる機序が関与する可能性が示唆された。

[西澤雅子、山本直樹、杉浦 互、加藤真吾(慶応大)]

7. 新規抗 HIV 薬の開発に関する研究

この研究では遺伝子組み込み酵素を標的にした増殖阻害物質の開発を目指し、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行なった。今までに 20000 個以上の化合物のスクリーニングを行い、従来とは異なる化合物を複数見出すことに成功した。抗 HIV-1 活性の認められた化合物のうち有望なものについては類縁化合物を多数合成し、抗 HIV 活性の増強および毒性の軽減を試みた。その結果 IC₅₀ の値を 100~1000 倍増強させることに成功した。見出した阻害剤は既存の治療薬剤に対して耐性を獲得したウイルスに対しても有効であった。阻害機序についてはまだ明らかではなく、薬剤耐性ウイルスの誘導、定量 PCR、time of addition 実験などの解析手法を用いてその解明に取り組んでいる。小動物を用いた抗ウイルス効果の確認、毒性に評価等、実用化に向けた *in vivo* 実験を実施している。

[武田 哲、三浦秀佳、巖 驊、西澤雅子、藤野真之、村田大悟、杉浦 互、田中晴雄(北里大学)、野村伸彦(富士化学工業株式会社総合研究所)]

8. CRF01_AE (サブタイプ E) HIV-1 ウイルスのプロテアーゼの結晶構造解析と数値モデル解析

従来の薬剤耐性研究はサブタイプ B を中心に行われてきたが、これにより得られてきた薬剤耐性に関する知見がそのまま non-B サブタイプにも当てはめることができるのか明確ではない。我々はいままでに CRF01_AE ではネルフィナビルに対する耐性変異が異なっておりサブタイ

ブ B で主に観察される D30N を取る確率は低く、代わりに N88S が獲得されることを明らかにしてきた。CRF01_AE では D30N が獲得されないのかそのメカニズムを構造科学的に明らかにするために HXB2-D25N, NH1-D25N, NH1-D25N/L10F, NH1-D25N/N88S, NH1-D25N/L10F/N88S 各々のプロテアーゼの精製を行い、現在結晶化に取り組んでいる。さらに、活性のあるプロテアーゼの作製・生成も行い、熱力学的解析に取り組んでいる。酵素学的な実験以外に、in silico での構造予測と N88S の役割についても解析を行っている。

[柿澤淳子、松田昌和(三菱化学メディエンス株式会社)、杉浦 互、大出裕高、松山 翔、星野忠次(千葉大学大学院薬学部)、セリア・シッファー(Univ. Massachusetts)]

9. プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 株に対するダルナピルの有効性についての解析

薬剤耐性症例に有効な新規のプロテアーゼ阻害剤(PI)ダルナピル(DRV)が大きな期待をもたれている。本研究では HIV 薬剤耐性遺伝子検査において既存 PI に対して高度耐性を呈する HIV 株に対する DRV の有効性についての評価を試みた。当施設において薬剤耐性遺伝子検査を実施した症例より、多数の薬剤耐性変異の集積が認められ薬剤耐性と判定された症例を選択し、健常人 PBMC との共培養による HIV の分離を実施した。分離・回収に成功した HIV 株については我々が樹立した human CD4, CXCR4, CCR5, LTR-Luciferase を発現するヒト T 細胞系細胞株である MaRBLE 細胞(Mizutani et al., 2007 JCM)を用いた薬剤感受性検査を実施した。JR-CSF 株を標準として fold resistance を算出した。感受性検査では DRV の他に薬剤耐性症例に有効であるとされるアタザナピル(ATZ)とロピナピル(LPV)についても評価を行った。合計 16 株の薬剤耐性 HIV の分離に成功した。JR-CSF 株における ATZ、LPV、DRV 其々の IC₅₀ は、0.0019 μM、0.006 μM、0.0014 μM であった。分離した 16 株のウイルスで 5~10、10~50 倍、50 倍以上の耐性を示した株数は ATZ で 1、5、7 株、LPV で 1、7、3 株(75%)、そして DRV では 3、0、0 株であった。DRV で 5-10 倍の耐性を示した 3 株はいずれも ATZ、LPV に対して高度の耐性を示した。反対に ATZ、LPV に対して 10 倍以上の耐性を示した臨床分離株の其々 75%、70% が DRV に対して感受性を示した。以上、本邦における薬剤耐性症例を救済する選択肢として DRV は有効であると考えられた。

[藤野真之、三浦秀佳、西澤雅子、松田昌和、鈴木寿子、杉浦 互]

10. タイ流行株 HIV-1 (CRF01_AE) の薬剤耐性スクリーニングとしての MS-PCR の有用性に関する研究

タイ政府が生産開始したジェネリック薬 GPOvir (d4T/3TC/nevirapine 合剤)の普及に伴い、耐性 HIV-1 株の流行が憂慮されるが、途上国で薬剤耐性株のモニターを行うことは難しい。そこで我々は、タイ流行株の GPOvir 耐性変異頻度に関するデータをもとに、変異分離型 PCR (MS-PCR) の原理を応用した GPOvir 耐性ウイルス簡便・敏速検出法を開発した。この方法は、従来のシーケンス法と比べ安価で、高度な機材を要しないが、高い検出感度を有することから、今後発展途上国における耐性株の流行モニタリングに寄与することが期待される。平成 16 年から 17 年にかけてランパンコホートで回収された GPOvir 脱落症例 64 例について通常の塩基配列解析と MS-PCR による検査を行い、その結果両者の一致率が 95%であることを明らかにし、MS-PCR がスクリーニング手法として活用できることを実証した。

[シリパン-センアローン・ワタナ-オウワニット(タイ国立衛生研究所)、パニータ-パチバニッチ(ランパン病院)、吉田レイミント・有吉紅也(長崎大学熱帯医学研究所)、松田昌和(三菱化学メディエンス株式会社)、杉浦 互]

11. Single genome sequencing を用いた薬剤耐性 HIV-1 の分子進化解析

薬剤耐性変異が生体内でどのように選択進化していくか解明することは薬剤耐性の病態を理解するうえで重要である。中でもプロテアーゼとその基質である Gag タンパク間には相互に干渉しながら進化選択を受けていると推察されている。本研究ではプロテアーゼと Gag の相互干渉(共振化)を明らかにするためにプロテアーゼ阻害剤耐性変異を獲得した症例について定期的にサンプルを採取し、Gag 全域とプロテアーゼ約 3.0Kb を Single genome sequencing 法によって増幅・クローニングし解析を行った。得られた配列は共進化解析プログラム CoMap を用いて解析し、同一分子内および分子間の干渉しあう変異の同定を行った。GagP453L とプロテアーゼの E35D に強い関連が認められた。また E35D はネルフィナビル耐性変異の D30N/N88D とも強い関連を示した。現在構造学的な視点より P453L と E35D 干渉の機序を解析している。

[杉浦 互、松田昌和(三菱化学メディエンス株式会社)、千葉智子、柿澤淳子、田中 博・任 鳳蓉・柴田潤子(東京医科歯科情報)]

12. HIV クローンを用いた決定木の作成

薬剤治療下におけるHIVの進化・選択を理解するために決定木(Decision Tree)の作成を試みた。薬剤治療中の3症例について血漿中のHIVをクローニングし、系統樹解析を行い、治療薬剤の組み合わせ及びアミノ酸置換をもとに逆転写酵素(RT)とプロテアーゼ(PR)領域について決定木の作成を行った。1症例あたり6~7サンプル・ポイント、各ポイントで15個以上のクローンを解析した。約120クローンについて決定木を作成した。作成した決定木を見ると、PRは35,74など薬剤耐性とは関係のないアミノ酸置換が、RTでは181,184,190など重要な耐性変異がツリーの分岐部に位置していることが明らかになった。平成17年度は比較的治療の類似した3症例を選び出し、同様の解析を行った。

[鈴木寿子、杉浦 互、田中 博・任 鳳蓉・茂柳 薫(東京医科歯科大学生命情報学)]

13. HIV-1の逆転写酵素が持つRNase H活性に対する特異的阻害剤の開発

逆転写酵素(Reverse Transcriptase;RT)に内在するRNaseH活性はレトロウイルス複製に必須である。次世代抗エイズ薬として、RNaseH活性を阻害するエイズ治療薬の開発を試みた。本スクリーニングにより、異なるHIV-1流行株および薬剤耐性HIV-1由来のRTに内在するRNase H活性を特異的に阻害する小分子化合物を複数同定した。これらの作用機序は、候補化合物がRNase Hの活性中心に結合することによるRNAのhydrolysis阻害と推測された。電算機を利用した立体構造解析をもとに、これらを取り化合物としてRNase Hを標的とした次世代抗エイズ薬の開発が期待できる。

[駒野 淳、浦野恵美子、二橋悠子、藤 秀義・星野忠次(千葉大学)、武部 豊、山本直樹]

14. HIV-1逆転写酵素polymerase active siteへの薬剤耐性変異が誘導するRNase H活性の低下と耐性亢進への寄与

我々は抗NRTI多剤耐性HIV-1(CRF01_AE)の11アミノ酸の挿入変異による耐性増強メカニズムの解明を試みた。精製酵素による酵素活性測定により、本変異がRNase H活性の低下を来すことを証明した。耐性亢進はpolymerase活性低下に伴うnucleotide excision活性の相対的上昇のためと推された。polymerase活性の減弱が逆転写過程を完遂するためには、RNase H活性が協調して減弱することが重要と考えられる。一方、nucleotide excision活性増強はRTのfidelityを上昇させ、ウイルスの多様化を妨げることが予想される。そのため、生体内でstrand

transfer活性が高いウイルス、つまり多様化し免疫逃避能力が高い多剤耐性ウイルスが生体内で選択された可能性が示唆された。

[駒野 淳、二橋悠子、磯貝まや、浜武牧子、松田善衛、椎野禎一郎、武部 豊、山本直樹、佐藤裕徳(病原体ゲノム解析研究センター)]

15. 経口投与可能な CXCR4 阻害剤の研究・開発

CXCR4 は HIV-1 の主要なコレセプターの一つであり、そのアンタゴニストは新しい作用機序を有する抗 HIV-1 剤の候補として期待されている。私達は、新規 CXCR4 アンタゴニスト KRH-3166 が経口投与可能で、in vitro、hu-PBL-SCID マウスモデルの両方で高い抗 HIV-1 活性を示すことを見出した。KRH-3153 は活性化 PBMC に対する X4 HIV-1 の増殖を低濃度 (EC_{50} : 4 nM) で阻害し、R5 ウイルスとの共感染も R5 阻害剤との併用で完全に抑制した。KRH-3153 と相互作用する CXCR4 のアミノ酸は、Asp171、Asp262、His281、Trp283 と推定された。KRH-3166 をラットに 10 mg/kg で経口投与したときの bioavailability は 17% に達した。hu-PBL-SCID マウスを用いた HIV-1 感染モデルにおいても自由飲水投与によって X4 HIV-1 感染を顕著に阻害した。以上の結果は、KRH-3166 はエイズに対する臨床応用に向けて有望な、経口投与可能な新規 CXCR4 アンタゴニストであることを示している。

[村上 努、田中勇悦・田中礼子・大隈 和(琉球大学) 熊倉 成・枝松剛生・広瀬国孝・谷中幹郎((株)クレハ) 山本直樹]

・ HIV の分子疫学ならびにウイルス学的研究

1. わが国における HIV 抗体陽性者からのウイルス分離とその特性解析

1988 年より HIV 抗体陽性者からのウイルス分離を行っており、平成 18 年度の検体数は 52 検体 (hemophilia : 49・その他の感染 : 3) で、そのうち陽性検体は 8 検体 (hemophilia : 5・その他 : 3) であった。2007 年 3 月時点で 4,322 検体 (hemophilia : 3,129・その他 : 1,193)、そのうち陽性検体は 898 検体 (hemophilia : 631・その他 : 267) に達した。これらのサンプルは血漿成分、細胞成分、それら DNA/RNA および分離臨床株として、レトロスペクティブな解析のためにセットで保管されており、国内の研究者の要望に応じて分与されている。その結果は抗エイズワクチンの開発および感染者の治療指針の確立のための資料として役立てられている。

[仲宗根正、堀端重男、服部真一郎、本多三男]

2. HIV-1 CRF07_BC の東アジアにおける流行拡大の年代推定

CRF07_BC は、1990 年代中頃に中国北西部（新疆ウイグル自治区）の注射薬物乱用者（IDU）の間に発生したアウトブレイクの原因ウイルスとして最初に同定されたアジアに特有の組換え型流行株（CRF）の一つである。さらに、近隣の台湾では 2002 年に入って IDU 間に爆発的な流行が発生し、これが CRF07_BC の侵淫によるものであることが明らかにされた。東アジア地域での CRF07_BC 流行の成り立ちに関するより深い理解を得ることを目的として、最新のデータ解析プログラム（系統樹・Bayesian coalescent 分析）を利用して、CRF07_BC 播種の時間スケールを推定した。その結果、中国雲南省で新生したと推定される CRF07_BC は、1990 年代初頭から半ば（1992-1995）にかけて、新疆の IDU 集団の流行を引き起こし、ついで 1990 年代後半（1998-2001）に入って、おそらく中国沿海部地域を經由して、台湾南部の IDU 集団に播種、さらに、2000 年代初頭（2001-2003）には、台湾中・北部に伝播し、台湾の IDU 間に未曾有の爆発的流行を引き起こしたと推定された。これらの知見は CRF07_BC の国際的・地域的播種の歴史をはじめて解明したものと考えられる。

[Kok Keng Tee、廖華南、上西理恵、長谷彩希、武部 豊、Oliver G. Pybus（オックスフォード大学）、Adeeba Kamarulzaman（マラヤ大学医学部）、Xiao-Jie Li（上海交通大学附属人民病院）]

3. アジアおよびベトナムにおける CRF01_AE 流行拡大の時間的・空間的経過の推定

HIV-1 CRF01_AE は東南アジア地域におけるエイズ流行の最も主要なウイルス株である。中央アフリカ地域に起源をもつ。1980 年代後半に北部タイの売春婦の集団に持ち込まれ、ついでタイ全域さらにカンボジア、ベトナム、ミャンマーなどの周辺東南アジア諸国に急速にその流行が拡大した。われわれは、CRF01_AE の東南アジア地域での流行拡大の時間的・空間的経過を解明するため、タイおよびベトナム各地域に分布するウイルス株の系統関係の差異に注目し、最新のデータ解析技術（BEAST v1.4.2）を用いて、ウイルス伝播の年代とその経路の推定を行った。その結果、系統樹上、CRF01_AE 株はクラスター 1 [タイ]、クラスター 2 [南部（カンボジア国境地域およびホーチミン市）の性感染者]、クラスター 3 [南部の IDU] とクラスター 4 [北部および隣接する中国 Guangxi の IDU (n=12)] の 4 つに分類された。BEAST プログラムを用いた分析によって、クラスター 2, 3, 4 の共

通祖先年代（Time to the most recent common ancestor (tMRCA) は、それぞれ 1986 年、1990 年、1993 年前後と推定された。これらの結果は、タイに起源をもつ CRF01_AE 株のベトナムへの伝播経路の少なくとも一つはカンボジア国境地域（An Giang）を経るもので、ベトナム南部、ついで drug trafficking 経路を介して北部地域さらに中越国境を越えて中国広西チワン族自治区へと拡大したことを示唆する。この成果は CRF01_AE の東南アジア地域における伝播経路とその年代を、確実な証拠をもってはじめて解明したものと考えられる。

[廖 華南、Kok Keng Tee、長谷彩希、上西理恵、Xiao-Jie Li、草川 茂、武部 豊、Nguyen tran Hien（ベトナム国立衛生疫学研究所）、Oliver Pybus（オックスフォード大学）]

4. HIV-2 感染後 36 年にわたる長期未発症例の解析：我が国における最古の HIV 感染症例の同定

われわれは、2006 年 6 月に我が国はじめての HIV-2 感染日本人症例（77 歳男性）を同定した。本症例から HIV-2 株を分離し、その全塩基配列の決定によって、本ウイルス株の起源、系統関係、感染経路の解明を行った。その結果、本 HIV-2 株は、HIV-2 グループ A に属し、特にセネガル株（60415K 株）等との近縁性が見い出された。本症例は、病歴から 36 年前（1971 年）のセネガルでの輸血で感染したと推定されるが、塩基配列情報に基づく系統関係は、その結論を裏付けるものである。HIV-2 ではエイズ発症までの潜伏期が HIV-1 に比べて長いと考えられているが、本症例は実に 36 年という極めて長期にわたって無症候であるという点で極めて興味深い。現在ウイルス側、宿主側要因の双方に関する解析が進行中である。また本症例は日本人症例として最古の HIV 感染者と推定される点で注目される。

[上西理恵、草川 茂、長谷彩希、廖 華南、小野木成美、武部 豊、内海孝信・永川博康（聖隷横浜病院呼吸器科）]

5. 我が国における CRF01_AE 感染クラスターの同定

我が国における HIV 感染者の約 75-80% は欧米型の HIV-1 サブタイプ B で、これについて重要なウイルス株が CRF01_AE で、全体の約 10-20% 前後を占めると考えられている。タイに起源をもつ CRF01_AE は 90 年代初頭に我が国に侵淫し、以来異性間感染のルートによって、次第に感染を拡げていると考えられるが、地域によっては、感染者のほとんど（80%以上）が、このタイプのウイルスによることをはじめて明らかにした。また、CRF01_AE が欧米起源のサブタイプ B とおそらく我が国

国内で組換えウイルスを新生したと考えられる症例が見出された。我が国における HIV 感染症の新しい動向を示すものと考えられる。

[長谷彩希、上西理恵、廖華南、草川茂、武部豊、長野県エイズ拠点病院ネットワーク(代表:須佐病院 斎藤博)]

6. CRF01_AE とサブタイプ B からなる新規組換えウイルス株 (URF) の同定とその公衆衛生上の意義に関する解析

HIV-1 組換えウイルスは世界流行を駆動するウイルス株の中で、重要性を増しつつある。我が国においては欧米に起源をもつサブタイプ B とタイに起源をもつ CRF01_AE とが 90 年代はじめよりすでに 10 数年にわたって co-circulate している。組換えが疑われる国内症例 3 例 (日本人症例 1; 外国人症例 2) に関してのほぼ完全長のウイルスゲノム塩基配列を決定した結果、いずれも CRF01_AE とサブタイプ B 間の新規組換えウイルス (Unique recombinant form, URF) であることを明らかにした。しかも、興味深いことには、日本人症例を含む 2 種のウイルスは、同一の組換え構造をもつことが明らかとなった。ここに見る組換えウイルスの検出は、我が国における HIV 感染症の動向変化の兆しの一つと考えられる。

[上西理恵、長谷彩希、廖華南、小野木成美、草川茂、武部豊、正兼亜季・上田幹夫 (石川県立中央病院)、近藤真規子・今井光信 (神奈川県衛研)、相良裕子 (横浜市市民病院)、花房秀次 (荻窪病院)、加藤真吾 (慶應義塾大学医学部)]

7. 家族内感染例 NH3 に見出された高度薬剤耐性の発達機構への組換えの関与

HIV-1 のゲノム間に生じる遺伝子組換えは、遺伝子座間の連鎖を解消して新たな組み合わせを生じることで、ウイルスの多様性の増大に寄与していると考えられている。薬剤耐性変異の一部では複数遺伝子座の組み合わせによって fitness が低下するエピスタシスが予想され、実際に耐性変異の適応進化が組換えによって生じやすくなっている例もある。遺伝子組換えがウイルスゲノムの多様性の形成に果たす役割は明らかであるが、その寄与の程度については情報が少ない。ウイルスの生存を左右する遺伝子型の多様性に対する組換えと突然変異の様々な選択圧における寄与を集団遺伝学的手法で推測し、in vivo, in vitro におけるそれらの値を比較した。エピスタシスが観察される遺伝子型として、RT 領域の 41L, 69 位挿入変異、210W, 215Y の 4 つの遺伝子座に注目した。in vivo

の観察例として、AZT+ddi による治療によってこれらの耐性変異が生じた日本人の感染例 (Sato et al 2001) を用いた。また、組換え直前の遺伝子型を持つ患者由来ウイルスの感染性クローンを作成し、薬剤耐性試験と種々の NRTI 濃度下における in vitro 競合感染実験を行った。感染者の各治療時期と競合感染実験の感染後のいくつかの時期に、RT 領域の配列クローン (590bp or 626bp) を多数採集し、塩基配列を得た。組換えの存在は、bootscan 解析・subregion tree・phylogenetic network 解析・IDL 検定・および in vitro においては人工的な中立変異の直接観察により行った。In vitro 実験では、近接変異座間の組換え価から交叉率を推定した。連鎖の解消が観察される遺伝子座ペアの関係を coalescent モデルに基づいて解析することで、組換えによって生じた遺伝子型の集団中での生存時間を推測することができる。突然変異の集団中での生存時間も同様に推測可能であり、この 2 つの推測値の比を求めることで、多様性に関する組換えの寄与を知ることが可能となる (Charpentier et al. 2006)。これらの推定には、LDHat パッケージ中の pairwise プログラムを用いた。様々な分子進化学的解析は、in vitro, in vivo 双方で耐性変異座間の組換えの存在を示唆した。in vitro 競合感染実験における遺伝子頻度の経時変化から、耐性変異の組み合わせに対する選択圧が確認されたが、個々の耐性変異には強い選択圧が観察されず、エピスタシスの状態にあることが示唆された。多様性に関する組換えと突然変異の寄与は、in vitro では薬剤環境にかかわらず一定であったが、in vivo では時期によって組換えの寄与が大きく変化することがわかった。

[椎野禎一郎、保科佳美、武部豊]

・ HIV-1 感染性クローン樹立法ならびに各種研究技術の確立

1. HIV-1 感染力価を迅速に測定する X4 および R5 に感受性を示す T 細胞系のレポーター細胞株 X4R5MaRBLE cell の樹立と実用化

ヒト T 細胞由来の細胞株 HPB-M(a) に LTR 制御のレポーター遺伝子 (EGFP, RFP, firefly luciferase) および CMV 制御の renilla luciferase を組み込み、HIV-1 の力価を定量する新たな細胞株 X4MaRBLE cell を樹立し薬剤感受性検査および新規薬剤スクリーニングなどに活用してきた。平成 16 年度には R5 嗜好性 HIV に対しても感受性を付与するために CMV 制御の CCR5 発現遺伝子を組み込み X4R5MaRBLE cell を完成させたが、その後の解析で同じ CMV 制御下の renilla luciferase の発現に影響を及ぼすことが判明し、CMV とは異なる house-keeping プ

ロモーター制御による CCR5 の発現への切り替えに取り組んでいる。現在臨床分離株に対する感受性検査の実用化に取り組んでいる。

[千葉智子、三浦秀佳、滝澤万里、松田昌和（三菱化学メディエンス株式会社）、松田善衛、本多三男、杉浦 互]

2. 競合的 RT-PCR を用いた HIV-1 感染患者血漿中のウイルスコピー数の定量

発展途上国でのモニタリングシステムとして安価な患者血漿中ウイルスの定量の開発・実用化に取り組んだ。共同研究者の加藤等が開発した env を標的にした競合的 RT-PCR による測定法を用いてアンプリコア HIV-1 モニター-ver1.5 でウイルスコピー数を定量した患者検体を測定した結果、アンプリコアの定量値と良好な相関性を示した。しかし、一部の検体で定量結果の乖離も認められたことから、広範囲の viral load を検出できるよう競合的 RT-PCR の系を改良した。まず標的遺伝子を Gag に切り替えるとともにプライマも新たに設計し、非 B サブタイプにも対応した系を確立した。

[濱武牧子、西澤雅子、柿澤淳子、杉浦 互、加藤真吾（慶應義塾大学）]

3. MDM に感染性を有する HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローン

これまでに私たちは、アジアにおいて収集、分離した HIV-1 分離株から、地域特異的に流行しているサブタイプ・CRF の感染性分子クローンを樹立してきた。CRF08_BC は中国南西部における主要な流行株である。私たちが分離株 HH040 から樹立した CRF08_BC 感染性分子クローンは、いずれも CCR5 をコレセプターとして使用する R5 ウイルスであったが、分離株が増殖する末梢血由来マクロファージ (MDM) では増殖できなかった。

そこで、すでに樹立したクローン HH040_22eapx4 の env 遺伝子を含む、制限酵素 PacI と XhoI で認識される領域を、同じテンプレートから新たに PCR によって増幅したフラグメントと置換したクローンを作製し、スクリーニングを行った。その結果、感染性を有する 3 クローンが得られた。それらはいずれも R5 ウイルスであった。MDM に対する感染性を検討したところ、そのうちのひとつが、MDM においてわずかに増殖した。その塩基配列を決定し、HH040_22eapx4 と比較したところ、envgp120 の V5 周辺に特徴的な 4 アミノ酸の変異と 1 アミノ酸の欠失が見られた。これらの変異が、MDM へのトロピズムに関係している可能性が示唆された。

[草川 茂、武部 豊]

4. マレーシアで同定した新しいタイプの組換え型流行株 CRF33_01B の感染性分子クローンの樹立

われわれは、一昨年、マレーシア大学医学部（クアラルンプール市）との共同研究によって新しいタイプの組換え型流行株 (CRF33_01B) を見出した。CRF33_01B は、我が国研究機関から報告され、国際的データベースから正式承認された初めての CRF となった。このウイルス株は CRF01_AE を骨格とし、プロテアーゼ RT 遺伝子部分が短い 2 つのサブタイプ B 断片からなる組換えウイルスであり、注射薬物乱用者 (IDU) の 40% に分布し、また性感染者の中にも数% 見出される。われわれは、PCR 法を用いた方法によって、感染性分子クローン (R5 型) を樹立した。現在、その性質を検討中である。

[Kok Keng Tee、Xiaojie Li、納富香子、草川茂、武部豊、Adeeba Kamarulzaman（マレーシア大学医学部）]

5. 感染性クローンの樹立と方法論の改良

著しい多様性を呈する HIV-1 をその特性を保持したまま迅速に感染性クローンを樹立することを目的に方法論の改良を引き続き試みている。HIV-1 全長ゲノム増幅に用いる PCR 酵素及び Primer 設計をさらに考慮したところ従来よりも迅速に多数の感染性クローンを樹立することが可能になった。この方法論を本邦新規感染者の多くを占める同性間感染で増加傾向が認められる subtype B ウイルスとセンター第 2 研究グループで収集している薬剤耐性ウイルス及び西アフリカ・ガーナ国感染者由来ウイルスに応用し総計 639 個に及ぶ多数の感染性分子クローンを樹立し、その内 51 個のクローンについて全ゲノム塩基配列を決定した。

(1) PCR 酵素選別による感染性クローン樹立の効率化

既に「HIV Trapping System」により感染性分子クローンが樹立できるようになったが、より効率的にするため市販されている High Fidelity, High Processivity, High Yield の PCR 酵素数種類を比較検討したところ、Roche 社の Pwo Master が最も高効率な感染性クローン樹立に適していた。しかしながら Pwo Mater によって増幅できない鑄型でも Stratagene 社の PfuUltra II Fusion DNA polymerase により効率的に Amplicon が得られるケースがあることが判明した。今後とも PCR 酵素の改良は進むものと期待されることから、Long PCR による「HIV Trapping System」はより有効になりうるものと考えられる。

[坂本優子、竹川奈穂、巽 正志]

(2) 邦人感染者由来 subtype B 感染性分子クローンの樹立と解析

昨年度は本邦での異性間性感染において流行している主要なウイルスである CRF01_AE 組換体の感染性分子クローンとしてタイ国流行初期のプロトタイプウイルスと邦人感染者から分離した臨床株から感染性分子クローンを構築整備した。一方本邦で主に同性間性感染により感染が拡大している subtype B ウイルスの感染性分子クローンについては一部昨年度に報告したが、いまだ充分なクローン数には至っていない。そこで本年度は本センター第 2 研究グループに薬剤耐性試験を依頼された検体から、未治療で Japan Consensus と考えられる 4 検体各株と、治療中で典型的な各種薬剤耐性プロフィールを呈するウイルス 6 株から総計 275 の感染性分子クローンを樹立した。そのうちから各株 2 クローンを選別し総計 20 クローンの全塩基配列を決定し、近隣結合法によって分子系統樹を作成しその帰属を決定したところ、全てのクローンは全長にわたり subtype B にクラスターされた。これらのクローンは今後同性間感染者で流行する subtype B の解析に有用であることが期待される。

[坂本優子、竹川奈穂、佐藤才恵、西澤雅子、杉浦 互、巽 正志]

(3) 本邦感染者における感染性分子クローンによる薬剤耐性獲得機序の解析

薬剤耐性ウイルスの出現は HIV 感染症治療において避けられない問題であるが、その耐性獲得の機序については不明な点が依然数多く残されている。高効率な感染性分子クローン樹立法を応用し、同一患者からの継時的なウイルス分離株から全長ゲノムを含んだ感染性分子クローンを複数個解析することにより新たな視野を広げる目的で解析を開始した。昨年度 2 名の患者から各々 3 ポイント総計 201 の感染性クローンを樹立し、そのうち各ポイント 10~12 クローンを選別し総計 71 クローンの全塩基配列を決定した。両ウイルスとも CRF01_AE 組換体であり、その pol 領域の薬剤耐性プロフィールは、予め Genotyping 法で予測した耐性変異の様々な組合せの多様性を示すクローンが含まれており、耐性変異は治療経過に伴って蓄積する傾向が認められ、系統樹解析により各ポイントの一部の耐性ウイルスが生延びて次の Major なグループを形成することがクローンレベルで判明した事を報告した。今年度はこれらの感染性クローンによる各種薬剤耐性プロファイルを、薬剤治療歴と併せて MAGIC-5/SEAP 細胞株を用いた Phenotypic Assay を行い Genotyping との相関を解析したところ、Genotyping では

捉えられない耐性を Phenotypic Assay が捉え、さらに Genotyping と乖離した耐性を示すクローンの組合せを明らかにすることが出来た。今後その耐性機序をこれらクローン間の組換えで責任領域を絞込んで解析していく予定である。

[坂本優子、竹川奈穂、橋本 修、石子博昭(三菱化学メディエンス) 松田昌和、西澤雅子、杉浦 互、巽 正志]

(4) 本邦感染者ウイルスから世界に先駆けた subtype F 及び BF 組換体感染性分子クローンの樹立

本センター第 2 研究グループに全国各地から薬剤耐性試験を依頼された検体から、env C2/V3 領域の RT-PCR による subtyping により subtype F と判定された臨床分離ウイルス 3 株より感染性分子クローン計 45 クローンを樹立し各ウイルス 2 クローンの全ゲノム塩基配列を決定したところ 2 臨床株は subtype F であり、1 臨床株は subtype B と subtype F の新たな構造を持つ組換体である事が判明した。これらのウイルスは南米ブラジルで流行しているウイルスであり、BF 組換体は San Paulo 市において近年特に流行が指摘されている組換体であることが知られている。これら subtype F の構成を持つ HIV-1 としては世界に先駆けての感染性分子クローンを樹立できた。これらのクローンは今後南米で流行するウイルスの浸淫をサーベイするに当たって有用であるものと期待される。

[坂本優子、竹川奈穂、西澤雅子、杉浦 互、巽 正志]

(5) Ghana で流行する HIV-1 の感染性クローンの樹立と解析: 世界に先駆けての CRF06_cpx 感染性分子クローンの樹立

Ghana に多剤併用療法を導入するにあたり、現地で流行している HIV-1 の特性を把握し、より現地のウイルスに則した薬剤感受性試験法開発のための分子基盤として感染性分子クローンの樹立を試みている。昨年度に引き続き今迄感染性分子クローンが得られなかった 9 臨床株について新たな Primer Set あるいは増幅酵素を試したところ、効率良く Amplicon が得られ感染性分子クローンが得られた。これで部売りできたウイルス全ての感染性分子クローンが得られた。各ウイルス株 2 クローン計 18 クローンの全塩基配列を決定し、近隣結合法によって分子系統樹を作成しその帰属を決定したところ、Heteroduplex Mobility Analysis(HMA)で subtype A に分類された 4 クローンは CRF02_AG 組換体であることから HMA は解析する領域を選別することが必要なが改めて確認された。本年度は新たに臨床分離株 03 G H 173 ウイルスから世界で初めての CRF06_cpx の感染性分子クローンを樹立した。

また CRF02_AG 組換え体と上記 CRF06_cpx の組換え体が見つかり、又 CRF02_AG の RT 領域前半に新たに subtype C が組込まれた組換え体を得られたことから、ガーナでは第 2 次、あるいは第 3 次の組換え体が流行し、その流行ウイルスの構造は複雑であり、既に CRF02_AG 組換え体を主体に様々な subtype/CRF 間の同時流行により複雑な組換え体が発生する埒場に成りつつあることが推測された。

[竹川奈穂、坂本優子、徳永研三(感染病理部)、N. Nii-Trebi (野口記念医学研究所、ガーナ)、佐多徹太郎(感染病理部)、巽 正志]

(6) 各種 subtype/CRF 感染性分子クローンを用いた抗原・抗体同時測定系の感度試験用標準パネルの作成

現在、本邦では HIV-1/2 感染診断の 1 次スクリーニング検査は、各保健所などで導入されている即日検査に用いられるイムノクロマト法を除いて、ウィンドウ期をより短縮するため抗原・抗体同時測定系が導入されている。各社より各種の検査キットが市販されているが、抗体出現前の抗原陽性期を如何に感度良く検出できるかは多くの場合 Seroconversion Panel を購入して対応しているが、この Panel が由来する HIV-1 subtype は限られており、その数量もまた限度があるなど、その標準抗原が国内外で依然として整備されていなく状況である。今回、我々がこれまで樹立してきた各種 subtype/CRF 感染性分子クローンが、これら抗原・抗体同時測定系の感度試験標準パネルとなりうるか、国内で市販されている検査キットを販売している検査会社の協力を得て、その感度測定を行なったところ、各種診断キットにより subtype/CRF により検出感度が大きく異なることが判明した。今後更に未だ樹立されていない subtype/CRF の感染性分子クローンを構築し、抗原検出の標準パネルとして整備に努める。

[坂本優子、竹川奈穂、巽 正志、水落利明(血液・安全性研究部)]

・ HIV ライフサイクルと宿主因子の研究

1. TNF/TNF レセプターファミリー分子、OX40L/OX40 の HIV-1 感染に与える影響

HIV-1 は宿主細胞上の CD4 およびケモカインレセプター(CXCR4, CCR5)を主なレセプターとして感染し、また増殖したウイルスは多くの宿主由来タンパク質をウイルス粒子に取り込み、宿主細胞から放出されることが知られている。その結果、取り込まれたそれぞれの宿主タンパク質がその後のウイルスの感染性に大きな影響を与えているということはこれまで数多く報告されている。我々は、HIV-1 の主な宿主細胞であり、感染や病態に大

きく関わる CD4 陽性 T 細胞が OX40 や OX40 リガンド (OX40L)を発現していることや樹状細胞や単球が OX40L を発現していることから、これらの分子が HIV-1 感染に何かしら影響を与えているものと考え、研究を開始した。まず、感染効率への影響を Single round の系を用いて調べるため、gag、pol、env 遺伝子欠損 Luciferase レポーター遺伝子導入型 pseudotype HIV-1 を 293T 細胞で作製した。このとき、OX40 や OX40L 遺伝子も 293T 細胞に co-transfection し、産生されてくるウイルスにこれらの分子が取り込まれてくるかを magnetic beads を用いた Immunocapture assay で調べた。その結果これらの Pseudotype HIV-1 は OX40、OX40L をエンベロープ上に取り込むことがわかった。またこれらの取り込まれた分子が機能的に働くかを調べるため、標的細胞として T 細胞株の Molt-4/CCR5 を用いて感染実験を行った。あらかじめ Molt-4/CCR5 に OX40 や OX40L を強制発現させ、OX40 や OX40L を取り込んだ Pseudotype HIV-1 を感染させた。3-4 日後 Luc assay を行ったところ、OX40 または OX40L を取り込んだ HIV-1 は取り込んでいないものに比べて明らかに感染を促進した。現在この感染が促進されるメカニズムについて調べている。

[高橋良明、田中勇悦(琉球大学)、村上努、駒野淳、田中礼子(琉球大学)、山本直樹]

2. 抗 Vpr 抗体の評価と臨床応用に向けた研究開発

新たに作成した抗 Vpr マウスモノクローナル抗体 4 サンプルと抗 Vpr ウサギ抗血清 2 サンプルの評価を行った。Vpr 発現ベクターを HeLa 細胞と COS7 細胞に導入して Vpr タンパクを発現させ、開発中のこれらの抗体・抗血清の反応性について共焦点レーザー顕微鏡による Vpr タンパクの細胞内局在の染色パターンの観察と SDS-PAGE による解析を行った。その結果抗 Vpr マウスモノクローナル抗体 1 サンプルと抗 Vpr ウサギ抗血清 2 サンプルが Vpr に特異的に反応する事が明らかになった。また Vpr への特異性は低い細胞内で Vpr と同じ局在を示す未知のタンパクと結合する抗 Vpr マウスモノクローナル抗体 1 サンプルを見出した。解析の結果、このマウスモノクローナル抗体は一つの核膜タンパクを特異的に認識していることが明らかになった。このマウスモノクローナル抗体がこの核膜タンパクと Vpr の両方を認識できることから、これら 2 つのタンパク間には共通な構造があることが示唆された。この核膜タンパクと Vpr の機能の類似性についてはこれまでに報告がなく、Vpr の機能解明の糸口として今後の解析が期待される。また Vpr に対して特異性を持つ抗体・抗血清については、これらを用いて患者

由来の血漿サンプル中の Vpr を測定し臨床応用への可能性を検討している。

[西澤雅子、山本直樹、岩谷靖雅、永田志保、杉浦 互、矢野竹男（オリエンタル酵母工業株式会社）]

3. LC-MS/MSによるHIV-1複製に關する宿主因子の解析

HIV-1感染、AIDS発症への抵抗因子の形で宿主因子の關与が注目されている。われわれは質量分析法を用いたプロテオミクスの手法を用いてHIV-1複製に影響を与える宿主タンパク質の同定を試みている。我々はFLAGタグを付加したHIV-1ウイルスタンパクMatrixを発現させ、これと相互作用をする宿主因子を免疫共沈降後の質量分析によって同定し、現在HIV-1複製への影響を探索中である。今年度はさらに、HIV-1 Envタンパクのウイルス粒子への取込みに關すると報告のあったTIP47と相互作用する宿主因子を同様の方法論で探索中である。これらはHIV-1遺伝子産物の機能解明に寄与するだけでなく、新たなウイルス増殖阻害手段の開発に役立つと考えられる。

[駒野 淳、篠田知宏、宮川 敬、吉川治孝・高橋信弘（東京農工大学）、村上 努]

4. ミリストイル化非依存的なHIV-1 Gagのassemblyおよびvirus-like particle産生

Gagのミリストイル化がGagの細胞膜targetingそれに続くGag集合・細胞表面への輸送・buddingに必須であると考えられてきたが、その実験的検証は間接的であった。我々はGagのミリストイル化シグナルを欠失させ、N末端にいくつかの異なる膜タンパク質を融合させた。これらを細胞に発現させ、共焦点顕微鏡による細胞内局在、電顕による形態観察、培養上清中のVLPの有無、産生効率、物理的性質を解析した。その結果、ミリストイル化はGagの集合・細胞表面への輸送・VLP産生に関しては膜タンパク質と交換可能であるが、VLP産生効率が低下することが判明した。ウイルスが進化の過程でミリストイル化を選択した理由が単にVLP産生効率を上げるためなのか今後の検討が必要と考えられた。

[青木 徹、二橋悠子、清水佐紀、松田善衛、山本直樹、駒野 淳]

・ HIV 感染動物モデルの開発に関する研究

1. Cell-associated virus 経粘膜感染によるサル・エイズモデル開発（ウイルス曝露非感染モデル）

ウイルス曝露非感染サルモデルの重要性は次のように

まとめられる。人類の中には HIV に濃厚に曝露されるも感染しないヒトが存在する。いわゆるウイルス曝露非感染者である。彼らは理想的な抗 HIV 免疫を獲得していると考えられているため、特にその粘膜免疫の解析はワクチン開発の重要課題となっている。しかしながら、症例の発掘が困難であり、なおかつ粘膜面の解析にはサンプリング量・回数ともに制限が大きい。また、チャレンジ実験が不可能なことから、その症例が真に抗 HIV 免疫を獲得しているのかという確認も不可能である。ウイルス曝露非感染サルモデルはそれらの問題を解決し、HIV 防御免疫本態の詳細情報を提供すると考えられる。昨年度確立した Cell-associated virus 経粘膜感染によるサル/エイズモデルを用いてウイルス曝露非感染サルモデル開発に着手した。まず、カニクイサル 9 頭について、50%感染成立量(AID50)の 1/10 という低力価でのウイルス感染細胞による頻回曝露実験を行った。これらのサルについて 10 倍の AID50 を有するウイルス感染細胞を攻撃接種することにより、防御免疫が誘導されているかを現在確認中である。

[仲宗根正、兼清 優、吉野直人、山本直樹、網 康至(動物管理室)]

2. ヒト PBMC 移植 NOD/SCID マウスを用いた *in vivo* におけるマンノースパインディングレクチンの抗 HIV 活性の評価

現在、HIV/AIDSの感染及び病態進行においてケモカインやウイルス感染レセプターの解明により、HIV感染症が自然免疫の強さと深く関わっていることが明らかとなっており、それらの発現は血中のウイルス量のコントロールと相関していることが示唆され、その重要性が明らかになりつつある。自然免疫における液性因子としてケモカインの他に動物レクチンがあり、血清中に認められる動物血清レクチンは、その性状や産生機構などの解析が進められており、生物学的に感染症のコントロールに寄与していることが示唆されている。その一つであるマンノースパインディングレクチン（MBL）は、HIVに対するその糖結合特異性から考えて広範なHIVウイルスのコントロールに寄与する可能性を有している。昨年までの我々の研究により、MBLや種々の組換えMBLの抗HIV活性を*in vitro*のPBMCを用いた中和アッセイでの検討を行った結果、各MBL産生クローンでHIV感染抑制活性に差はあるがHIV感染防御能が確認できている。今回、生体内でのMBLの作用を明らかにするために、ヒトPBMCを移植したhu-PBL-NOD/SCIDマウスにHIV-1臨床分離株を腹腔接種するHIV/AIDS小動物評価系を用いて、動物レ

クチンとして開発された組換えMBLの抗HIV活性を評価した。各組換えMBLを用いて各々をマウスに単回投与した後、コピー数を測定することでウイルス感染時における防御反応を検討した。結果として、MBLはHIVの中和抗体の受動免疫に比べて、感染を完全に阻止しないが、明らかにウイルス増殖を抑制することを認めた。従って、*in vitro*の中和実験の結果を加味すると、広範囲に*in vivo*でも機能することが示唆された。

[堀端重男、網 康至(動物管理室)、大谷克城(旭川医科大学)、坂本隆志・岸雄一郎・木佐木博(扶桑薬品)、鈴木定彦(北海道大学)、駒野 淳、山本直樹、若宮伸隆(旭川医科大学)、本多三男]

3. ヒト胎児胸腺・肝臓移植マウスを用いた T リンパ球のサブセットの解析と HIV-1 感染

小動物を用いた HIV/AIDS モデル動物の開発において、我々のグループではNOD/SCIDマウスにヒトPBMCや胎児組織を移植することによりヒトでの HIV 感染を想定したマウス HIV 感染モデル系を作成し利用してきた。ヒト PBMC 感染モデルで見られたこの動物モデルの特徴は X4 野生型ウイルスの感染を再現できることであったが、移植後ナイーブ細胞が消失していくため、初期免疫反応を誘導するのが困難であった。しかし、今回行ったヒト胎児胸腺・肝臓組織を移植した NOD/SCID-hu Thy/Liv マウスは、ヒト PBMC 移植モデルでは消失していく末梢ナイーブ T 細胞の長期にわたる産生能が確認された。さらに、静注による X4 ウイルス接種で HIV 感染が成立し、CD4⁺CD8⁺ DP 胸腺細胞の減少や、ヒト PBMC 移植モデルマウスで見られた末梢 CD4⁺ T リンパ球の減少と末梢ウイルスコピー数の増加といった HIV 感染時に特徴的に起こる反応が見られ、特に移植胸腺細胞から感染力の高いウイルスが得られた。一方、R5 ウイルス接種でも感染が成立し、移植組織より末梢に産生されたヒト細胞が生着したマウス脾臓細胞から感染力の高いウイルスが分離された。この結果は X4 がナイーブ、R5 がメモリー細胞を標的とするトロピズムの異なる HIV 感染における病原性を再現しており、HIV 感染モデルとしての有用性が示唆された。

[堀端重男、網 康至(動物管理室)、玉岡有告(済生会中央病院)、山本直樹、本多三男]

4. マウス HIV 感染モデルを用いた新規 HIV 感染症治療薬剤の開発

RAG2 SCID マウスの脾臓にヒト末梢血リンパ球を移植した hu-PBL-SCID マウス/HIV 感染モデルを構築し、

我々が取り組んでいる新規抗 HIV 薬剤の *in vivo* における HIV 増殖抑制効果について評価を行った。感染成立後に開発中の薬剤で最も有望な化合物を投与した群、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤ネヴィラピンを投与した群、そして薬の投与を行わなかった対象群の 3 群について 7 日、14 日の時点で血中ウイルス量の測定と CD4 陽性細胞数の測定を行った。その結果我々の開発している新薬はネヴィラピンと同等もしくはそれ以上の阻害活性を呈することが確認された。

[西澤雅子、武田 哲、三浦秀佳、巖 驊、藤野真之、村田大悟、杉浦 互、野村伸彦(富山化学工業株式会社総合研究所)]

5. NOG マウスを用いた HIV-1 持続感染モデルの開発

最近開発された NOD/SCID/gamma(c)(null) マウス (NOG マウス) は、ヒト造血幹細胞の生着に優れ、ヒト T 細胞を含めた各種リンパ球の発生も起こることから、新しい HIV-1 感染モデルとして期待される。本研究では、移植後出現するヒト細胞の詳細な解析および HIV-1 感染後のウイルス動態の解析を行い、このマウスの HIV-1 感染モデルとしての有用性を検討した。6~10 週齢の NOG マウスに、 $1 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$ 個の CD34 陽性細胞を静注した。移植後 2~7 ヶ月のマウスから各臓器を回収し、発生したヒト細胞の解析を行った。移植後 3 ヶ月以降のマウスについて、R5 HIV-1JRCFS および X4 SHIV-C2/1 を 8 匹ずつ尾静脈より投与し、感染後 2 ヶ月までのプラズマ中のウイルスコピー数を測定した。造血幹細胞移植後、ヒト B 細胞の発生がまず見られ、4 ヶ月以降にヒト T 細胞の顕著な増加がみとめられた。脾臓中には、ヒトリンパ球に加えて、ヒト単球/マクロファージや樹状細胞が観察された。HIV-1 を投与した結果、R5 および X4 HIV-1 両方に感染し、プラズマ中には高いウイルスコピー数が検出された。この viremia は投与後 40 日以降も安定してみられた。本研究により、ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスは、長期かつ安定に HIV-1 に感染し、さらに一部のマウスでは、特異的な抗 HIV 抗体賛成が見られたことから、有用な HIV-1 の感染モデルになることが明らかとなった。

[渡辺 哲(東京医科歯科大学難治研) 寺嶋一夫(東京医科歯科大学大学院) 太田信頼、堀端重男、伊藤 守(実中研) 清水則夫(東京医科歯科大学難治研) 本多三男、山本直樹]

6. CCR5 tropic subtype C HIV-1の遺伝子を持つ新規SHIVの作製

HIV-1に対する候補ワクチンを評価するためのマカクザルの感染実験には、SIV、或いはSIVとHIV-1のキメラウイルス (SHIV) が広く用いられている。現在用いられているSHIVはsubtype B HIV-1由来の遺伝子を持つものが殆どであり、他のsubtypeのHIV-1遺伝子を持つSHIVの実用化が望まれている。そこで本実験では、アフリカのザンビア共和国に由来するCCR5 tropic subtype C HIV-1の遺伝子を持つ新規SHIVを作製し、その性状をサルリンパ球を含む種々の培養細胞を用いて解析、マカクザルの動物実験に有用と思われるものを選抜することを計画した。まず、ウイルス10株より得られた17種のHIV-1分子クローンをもとに、22種の組換えSHIVクローンを作製した。これらの感染性を、R5、及びX4 HIVが感染・増殖できるように改変したHeLa細胞 (MAGIC-5A細胞) を用いて調べた結果、13クローンが明瞭な感染性を示した。現在、カニクイザルPBMCを用いて、ウイルスクローンの増殖性の確認試験を行っている。

[阪井弘治、巽 正志、山本直樹]

・その他

1. HIV 感染症統合データベースの運用

エイズワクチン開発に重要な情報をデータベース (DB) 化して公開 (一部制限) し、HIV 関連研究者に活用してもらうことを目的として HIV 感染症統合データベース (略名: HIV-DB、URL: <https://aids.nih.go.jp>) を構築し、運用している。

本 DB では、国立感染症研究所・エイズ研究センターにおいて 1989 年から解析中の日本およびタイ国 HIV 感染者からのウイルス分離結果、遺伝子配列、蛋白構造情報などのウイルス遺伝子生物学的情報に加えて、臨床データを時系列に管理・検索可能となる統合 DB を構築し WEB 上で提供する。

DB 内容は、平成 19 年 3 月末現在、DDBJ の HIV 遺伝子 DB (135,338 件) に加えて、提供 HIV 感染者 572、ウイルス分離解析数 3,669、C2V3 遺伝子解析数 361、V3 部蛋白構造解析数 361 (PDB 形式)、対応臨床データ (生年、性別、CD4 細胞数、血漿ウイルス量、血漿ウイルス逆転写酵素活性、薬剤履歴、その他) からなる。主機能は、DDBJ の HIV 遺伝子データに対する遺伝子同源性検索、遺伝子系統樹解析、genosubtyping、独自の division 作成機能、V3 部蛋白 3 次元構造の閲覧機能、臨床データ検索機能である。

本 DB は、研究情報データベース化事業の 1 つとして

国立感染症研究所と科学技術振興事業団と共同で開発され、平成 14 年 10 月に WEB 公開された。

[仲宗根正、科学技術振興機構]

2. HIV-1 の宿主である CD4 陽性 T 細胞のアポトーシス: OX40/OX40L システムの関与

TNF レセプターファミリー分子、OX40 (CD134) は主に活性化 T 細胞上に発現し、そのリガンドである OX40L の結合により、TRAF2 と TRAF5 を介して転写因子 NF-

B を活性化し、細胞増殖や分化に働くことが知られている。我々もまた、HIV-1 感染 T 細胞において OX40 からのシグナルが NF- B を活性化し、その結果ウイルス産生を促進させること、また OX40 からのシグナルにより HIV-1 感染 T 細胞が細胞死 (アポトーシス) も引き起こすことをすでに報告している。一般に HIV-1 感染では、宿主細胞内で産生されるウイルス由来タンパク質が細胞死を誘導したり、ウイルスが細胞から放出される際に物理的に細胞を破壊したり、また Fas/FasL や DR/TRAIL や TNF-RI/TNF が感染細胞に発現誘導され細胞死を引き起こすといったことが報告されている。しかし、全 CD4 陽性 T 細胞のうち HIV-1 感染している T 細胞は数パーセント程度とも言われており、その T 細胞数激減のメカニズムについてはまだはっきりしていない。そこで、OX40/OX40L システムによる細胞死がこれまでに報告されているような HIV-1 感染によるものか、それとも感染していない細胞でも起こりうるものか調べることにした。まず、ヒト OX40 発現ベクターを、エレクトロポレーション法により様々な T 細胞株、単球系細胞株、B 細胞株に導入し、安定に OX40 を発現する細胞株を樹立した。続いてこれらの細胞株にパラフォルムアルデヒド固定したヒト OX40L 発現マウス細胞株を加え、刺激培養した。細胞の生存率はエオシン染色法と一部 Annexin V-FITC/PI 染色法により調べた。その結果、樹立したほとんどの T 細胞株で OX40 刺激により 24 時間以内に細胞死が引き起こされた。このことから OX40 刺激による T 細胞死は HIV-1 に感染していなくても起こりうるということがわかった。しかし OX40 は細胞死シグナルに重要な Death Domain を細胞内領域に持たないことから、これまで細胞死に関与するという報告はない。現在このアポトーシスのメカニズムについて調査中である。

[高橋良明、田中勇悦・田中礼子 (琉球大学)、山本直樹]

3. HIV-1 におけるヒト遺伝子転移 (human sequence transduction)

われわれは、HIV-1 CRF01_AE 感染日本人症例に、逆

転写酵素遺伝子のフィンガー領域への 33-ヌクレオチドからなる遺伝子挿入による極めて特殊な高度多剤耐性株を見出したが、この挿入変異がどのような機構で発生したか、またその起源は不明であった。この挿入配列の由来を解明するために、全ヒトゲノム配列に対して相同性 (BLAST) 検索を行った結果、ヒト 17 番染色体にほぼ完全な相同配列が存在することを明らかにした。HIV-1 を含むレトロウイルスでは、染色体にプロウイルスとして組み込まれた場合、約 10% のプロウイルス転写産物は、read-through を起こし、HIV-1 RNA とヒト遺伝子に由来するキメラの転写産物が生成する。このキメラの RNA ゲノムと正常な HIV-1 ゲノムが対合し、逆転写反応が起こった場合、両ゲノムの間で微小な相同配列を利用して鋳型乗り換え (いわゆる microhomology-guided template switch) が起こり、HIV-1 ゲノムにヒトゲノムに由来する遺伝子配列が取り込まれたと考えられる。このような現象の古典的な例は、宿主の増殖・細胞周期関連遺伝子の取り込みによる腫瘍原性レトロウイルス (例: ラウス肉腫ウイルス) の発生である。HIV-1 は、他のレトロウイルスに比しても、より高い変異性 (mutagenicity) と組換え能力 (recombinogenicity) をもち、さらに一日当たり 10^{9-10} に及ぶ高い増殖能力に加え、長期にわたる持続感染を引き起こすことから、そのゲノム多様性は極めて高いレベルにまで達し、薬剤耐性や免疫学的エスケープが容易に起こりやすいなどの際立った性質のウイルス学的基盤となっている。その可塑性が宿主遺伝子の取り込みにまで及ぶことを示した初めての報告であると考えられる。 [Alice Telesnitsky (ミシガン大学微生物) 武部 豊]

4. ポスト HAART 時代のエイズおよびエイズ関連感染症克服のための創薬シーズ探索: HCV クローン JFH-1 を用いた感染・増殖アッセイに基づくスクリーニング法の樹立とそれによる新規 HCV 阻害剤の同定

多剤併用療法 (HAART) が導入されて以来、我が国を含む先進工業国においては、エイズ死亡率が激減し、エイズ患者の予後の画期的な改善を見ている。しかし、HAART によりエイズ患者の予後が大幅に改善された結果、エイズに関連する HCV や EBV などのウイルス感染症による重篤な肝疾患や悪性リンパ腫による死亡率が高まってきており、「ポスト HAART 時代」の重要な医療課題の一つとなりつつある。HCV や悪性リンパ腫に対する治療の選択肢は限られており、安全で且つ有効性の高い治療薬の開発が待ち望まれている。われわれは、中でも重要性の高い HCV に注目し、脇田らによって樹立された感染性 HCV クローン (JFH-1) を用いた HCV の感染・

増殖アッセイ系を樹立・最適化した。HCV サブゲノムを用いるレプリコン・アッセイでは不可能であったエントリー、脱殻などの感染初期過程や、ウイルス粒子放出などの感染最後期過程に対する阻害剤の総合的探索が可能となった。この系を用いて、低分子化合物ライブラリー (分子量 300-500) をスクリーニングした結果、数種のヒット化合物を同定した。各化合物の抗 HCV 増殖阻害効果の IC₅₀ は約 0.1-3 uM、CC₅₀ は数 10 uM であった。興味深いことに、うち 2 種の化合物は、replicon assay では抗ウイルス活性を示さず、また HCV E1/E2 をエンベロープにもつ pseudovirion の感染を阻害することから、作用点が感染初期段階にあることが推定された。化合物のいくつかは、subgenomic replicon assay および pseudovirion assay の結果から、エントリーあるいは感染最後期過程の阻害剤である可能性が示唆される。現在、これら新規阻害剤の作用機構の詳細とその構造活性相関に関する解析が進行中である。

[上西理恵、磯貝まや、納富香子、長谷彩希、廖 華南、加藤佳代子、武部 豊、鈴木亮介・鈴木哲朗・脇田隆字 (ウイルス第二部)]

国際協力関係業務

・ JICA との共催による HIV-1 診断技術講習 (平成 18 年 6 月 12 日 ~ 7 月 14 日 第 4 回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース)

現在世界的に拡大を続けている HIV-1 感染、AIDS 発症の予防のためには、HIV-1 の蔓延状況の正確な把握が欠かせない。このためには確固とした診断技術に基づいた HIV-1 感染診断が必須である。近年 HIV-1 の感染診断は従来の感染の有無のみを判断する血清学的診断に加えて、感染ウイルスの質、量を知ることができる PCR 法に基づいた診断法が重視されるようになってきている。しかし、現在感染の中心となっている第三世界では必ずしもこれらの診断技術が確立されていないのが現状である。これらの状況に対応するため当センターでは JICA との共催により第三世界の研修員を対象に HIV-1 の感染診断のための技術講習コースを毎年 1 回開催している。過去 2 フェーズ (各フェーズ 5 年) に渡って血清診断を中心とした研修を行ってきたが、近年の核酸に基づいた診断技術への需要に答えて、平成 15 年度からは「HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術」と名称を改め PCR や塩基配列解析などを含めた研修を行っている。平成 18 年度にはケニア、モザンビーク、フィリピン、セーシェル、ジンバブエ、パプア・ニューギニア、マラウイー、エチオピア、ミャンマー、フィジーの各国 1 名 (計 10 名)

の研修員を対象に6週間にわたって村山分室研修棟を中心として技術研修を行った。研修内容は診断に必要な関連分野の講義、診断技術実習、施設訪問等を組み合わせたもので、実習は3つの小グループ制で行った。特に近い将来核酸技術に基づいた診断方法の導入予定の国が多いことから研修に対して研修生から高い評価を得た。

[村上 努、仲宗根正、杉浦 互、鈴木寿子、西澤雅子、藤野真之、武田 哲、武部 豊、椎野禎一郎、草川 茂、巽 正志、阪井弘治、松田善衛、石川晃一、森 一泰、駒野 淳、山本直樹、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、木村幹男(感染症情報センター)、菊池 嘉(国立国際医療センター)、若杉なおみ(早稲田大学)、畢 秀瓊(国立国際医療センター)、増田道明(獨協医科大学)、俣野哲朗(東京大学医科学研究所)、加藤真吾(慶應義塾大学)、小柳義夫(京都大学)、前村大成(東京都西赤十字血液センター)、吉野直人(岩手医科大学)]

・その他

1. JICA ジェンダーの視点を取り入れた社会福祉政策の視察研修 講師(平成18年8月30日)[山本直樹]
2. JICA ナイジェリア HIV 感染予防対策研修コース(北海道大学)講師(平成18年9月1日)[杉浦 互]
3. JICA ナイジェリア HIV 感染予防対策研修コース 講師「日本の HIV/AIDS の現状と対策について」(平成18年9月7日)[村上 努]
4. 日本学術振興会 論博研究者受入(平成18年9月25日~11月18日)[杉浦 互]
5. 結核予防会 アジア地域エイズ専門家研修 講師(平成18年10月13日)[松田善衛]
6. JICA ミャンマー主要感染症対策プロジェクト、カウンターパート研修、HIV/AIDS 対策 講師(平成18年12月7日)[巽 正志]
7. JICA カメルーン国社会問題省調査団視察 講師(平成19年3月15日)[山本直樹]

研修業務

・第17回 HIV-1, HIV-2 検査法(PCR法等)技術研修会(平成18年10月18日・20日)

都道府県・政令市・特別区の地方衛生研究所及びエイ

ズ治療の地方ブロック拠点病院等の検査従事者を対象とした HIV 検査法(PCR法等)を用いた HIV 感染症の診断技術研修会を行った。全国の地方衛生研究所等への普及と標準化を図り、わが国における検査体制の充実を図ることを目的とする。

[杉浦 互、武部 豊、椎野禎一郎、草川 茂、石川晃一、駒野 淳、鈴木寿子、西澤雅子、藤野真之、武田 哲、山本直樹、今井光信(神奈川県衛生研究所)、嶋 貴子(神奈川県衛生研究所)、加藤真吾(慶應義塾大学)、湯永博之(国立国際医療センター)、有吉紅也(長崎大学熱帯医学研究所)]

・その他

1. 医師卒後臨床研修プログラム 講師「エイズの現状と問題点」(平成18年12月15日)[村上 努]

発表業績一覧

・誌上発表

1. 欧文発表
 - 1) Dewan MZ, Terunuma H, Toi M, Tanaka Y, Katano H, Deng X, Abe H, Nakasone T, Mori N, Sata T, Yamamoto N. Potential role of natural killer cells in controlling growth and infiltration of AIDS-associated primary effusion lymphoma cells. *Cancer Sci.* 97: 1381-1387, 2006.
 - 2) Ono S, Kurotaki T, Nakasone T, Honda M, Boon-Long J, Sawanpanyalert P, Kimura K. Cost-effectiveness analysis of antiretroviral drug treatment and HIV-1 vaccination in Thailand. *Jpn J Infect Dis.* 59: 168-173, 2006.
 - 3) Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin KQ, Yamamoto H, Okuda K, Yamamoto N, Honda M. Induction of positive cellular and humoral immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus gag/pol. *J Immunol.* 176: 1784-1795, 2006.
 - 4) Eda Y, Takizawa M, Murakami T, Maeda H, Kimachi K, Yonemura H, Koyanagi S, Shiosaki K, Higuchi H, Makizumi K, Nakashima T, Osatomi K, Tokiyoshi S, Matsushita S, Zolla-Pazner S, Yamamoto N, Honda M: Sequential immunization with V3 peptides from primary HIV-1 produces cross-neutralizing antibodies against primary isolates with matching narrow neutralization sequence motif. *J Virol* 80: 5552-5562, 2006.
 - 5) Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S,

- Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology*, 80: 5563-5570, 2006.
- 6) Motohara M, Ibuki K, Miyake A, Fukazawa Y, Inaba K, Suzuki H, Masuda K, Minato N, Kawamoto H, Nakasone T, Honda M, Hayami M, Miura T. Impaired T-cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic chimeric simian-human immunodeficiency virus (SHIV) infection in contrast to less pathogenic SHIV infection. *Microbes & Infection*, 8: 1539-1549, 2006.
- 7) Miyake A, Ibuki K, Enose Y, Suzuki H, Horiuchi R, Motohara M, Saito N, Nakasone T, Honda M, Watanabe T, Miura T, Hayami M. Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection. *Journal of General Virology*, 87: 1311-1320, 2006.
- 8) Misumi S, Nakayama D, Kusaba M, Iiboshi T, Mukai R, Tachibana K, Nakasone T, Umeda M, Shibata H, Endo M, Takamune N, Shoji S. Effects of immunization with CCR5-based cycloimmunogen on simian/HIVSF162P3 challenge. *J Immunol*. 176:463-71, 2006.
- 9) Okamura T, Someya K, Matsuo K, Hasegawa A, Yamamoto N, Honda M. Recombinant vaccinia DIs expressing simian immunodeficiency virus Gag and Pol in mammalian cells induces efficient cellular immunity as a safe immunodeficiency virus vaccine candidate. *Microbiol. Immunol*. 50: 989-1000, 2006.
- 10) Hamano T, Matsuo K, Hibi Y, Takahashi N, Sawanpanyalert P, Yanai H, Hara T, Yamazaki S, Yamamoto N, Okamoto T. A single synonymous mutation in gag gene controlling human immunodeficiency virus type 1 virion production. *J. Virol*. 81: 1528-1533, 2006.
- 11) Koga I, Odawara T, Matsuda M, Sugiura W, Goto M, Nakamura T, Iwamoto A. Analysis of HIV-1 sequences before and after co-infecting syphilis. *Microbes Infect*. 8(14-15): 2872-2879, 2006.
- 12) Omura M, Furuya K, Kudo S, Sugiura W, Azuma H.: Detecting IgM antibodies against microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tubes in sera from healthy and HIV-infected Japanese. *Clin Vaccine Immunol*. 14(2): 168-172, 2006.
- 13) Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Van Laethem K, Deforche K, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, Pillay C, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Brun-Vezinet F, Reid C, Cahn P, Brigido LF, Grossman Z, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan RP, Camacho R, Schapiro JM, Katzenstein D, Vandamme AM.: Discordances between Interpretation Algorithms for Genotypic of Human Immunodeficiency Virus Are Subtype Dependent. *Antimicrob Agents Chemother*. 50(2): 694-701, 2006.
- 14) Ode H, Neya S, Hata M, Sugiura W, Hoshino T. Computational simulations of HIV-1 proteases-multi-drug resistance due to nonactive site mutation L90M. *J Am Chem Soc*. 128(24): 7887-7895, 2006.
- 15) Naito Y, Ui-Tei K, Nishikawa T, Takebe Y, Saigo K: siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucl. Acid Res. (Web Server issue)* 34: W448-W450, 2006.
- 16) Takebe Y, Telesnitsky A: Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate *via* human sequence transduction. *Virology* 351: 1-6, 2006.
- 17) Murakami Y, Yamagoe S, Noguchi K, Takebe Y, Uehara Y, Fukazawa H: Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. *J. Biol. Chem*. 281(38): 28113-28121, 2006.
- 18) Tee K K, Li X-J, Nohtomi K, Ng K P, Kamarulzaman A, Takebe Y: Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J. AIDS* 43(5): 523-529, 2006.
- 19) Rodriguez MA, Chen Y, Craigo JK, Chatterjee R, Ratner D, Tatsumi M, Roy P, Neogi D, Gupta P: Construction and characterization of an infectious molecular clone of HIV-1 subtype A of Indian origin. *Virology* 345: 328 – 336, 2006.
- 20) Miyauchi K, Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N: Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother* 17(4):

- 167-174, 2006.
- 21) Miyauchi K, Curran R, Matthews E, Komano J, Hoshino T, Engelman DM, Matsuda Z. Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions. *Jpn J Infect Dis.* 59(2): 77-84, 2006.
- 22) Huy TT, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi T, Nakajima A, Ansah J, Tetteh JO, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Adjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K: Characteristic of hepatitis B virus in Ghana: full length genome sequences indicates the endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol.* 78: 178-184, 2006.
- 23) Ozawa S, Eda H, Hayashi K, Cooperation Group for HSV-1 RFLP Variants Study, Yoshino K, Yanagi K: The geographical distribution of the herpes simplex virus-1 BgK_L variant in Japan is a gradient suggesting gradual dispersion of the virus from Shikoku Island to the other islands. *J Clin Microbiol* 44: 2109-2118, 2006.
- 24) Kitamura R, Sekimoto T, Ito S, Harada S, Yamagata H, Masai H, Yoneda Y, Yanagi K: Nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 mediated by NPI-1 (importin $\alpha 5$) is up- and down regulated by phosphorylation of the nuclear localization signal for which 379Lys and Arg380 are essential. *J Virol* 80: 1979-1991, 2006.
- 25) Yamamoto M, Okamoto T, Takeda K, Sato S, Sanjo H, Uematsu S, Saitoh T, Yamamoto N, Sakurai H, Ishii KJ, Yamaoka S, Kawai T, Y Matsuura, Takeuchi O, Akira S: Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol.* 7(9): 962-970, 2006.
- 26) Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N: Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 60: 273-276, 2006.
- 27) Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Lu KP, Yamaoka S: Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol.* 7: 598-605, 2006.
- 28) Tamamura H, Ojida A, Ogawa T, Tsutsumi H, Masuno H, Nakashima H, Yamamoto N, Hamachi I, Fujii N: Identification of a new class of low molecular weight antagonists against the chemokine receptor CXCR4 having the dipicolylamine-zinc(II) complex structure. *J Med Chem.* 49: 3412-3415, 2006.
- 29) Tamamura H, Tsutsumi H, Masuno H, Mizokami S, Hiramatsu K, Wang Z, Trent JO, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Fujii N: Development of a linear type of low molecular weight CXCR4 antagonists based on T140 analogs. *Org Biomol Chem.* 4: 2354-2357, 2006.
- 30) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamazaki T, Yamamoto N, Honda M: Novel two-parameter flow cytometry (MIL4/SSC followed by MIL4/CT7) allows for identification of five fractions of guinea pig leukocytes in peripheral blood and lymphoid organs. *J Immunol Methods.* 311(1-2): 47-56. 2006.
- 31) Shigeta S, Mori S, T Yamase, Yamamoto N, Yamamoto N: Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. *Biomed Pharmacother.* 60(5): 211-219, 2006.
- 32) Nimura F, Zhang LF, Okuma K, Tanaka R. Sunakawa H, Yamamoto N, Tanaka Y: Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation, and differentiation of monocytes into potent dendritic cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 231: 431-443, 2006.
- 33) Horiuchi S, Yamamoto N, Dewan MZ, Takahashi Y, Yamashita A, Yoshida T, Nowell MA, Richards PJ, Jones SA, Yamamoto N: Human T-cell leukemia virus type-I Tax induces expression of interleukin-6 receptor (IL-6R): Shedding of soluble IL-6R and activation of STAT3 signaling. *Int J Cancer.* 119(4): 823-830, 2006.
- 34) Dewan MZ, Uchihara JN, Terashima K, Honda M, Sata T, Ito M, Fujii N, Uozumi K, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kubuki Y, Okayama A, Toi M, Mori N, Yamamoto N: Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood.* 107: 716-724, 2006.
- 35) Yamaguchi K, Sugiyama T, Takizawa M, Yamamoto N, Honda M, Natori M: Viability of infectious viral particles of HIV and BMCs in breast milk. *Clin Virol.* 39: 222-225, 2007.
- 36) Ode H, Matsuyama S, Hata M, Hoshino T, Kakizawa J, Sugiura W: Mechanism of drug resistance due to N88S in CRF01_AE HIV-1 protease, analyzed by molecular dynamics simulations. *J Med Chem.* 50(8): 1768-1777, 2007.
- 37) Chiba-Mizutani T, Miura H, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Miyauchi K, Nishizawa M, Yamamoto N,

- Sugiura W.: Use of new T-cell-based cell lines expressing two luciferase reporters for accurately evaluating susceptibility to anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs. *J Clin Microbiol.* 45(2): 477-487, 2007.
- 38) Hamatake M, Nishizawa M, Yamamoto N, Kato S, Sugiura W: A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-BRNA in plasma. *J Virol Methods.* 142: 113-117, 2007.
- 39) Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Nakagiri I, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W: Nationwide Survey of Drug-Resistant HIV-1 Prevalence in Patients Newly Diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res.* 75(1): 75-82, 2007.
- 40) Kasso A, Fujino M, Matsuda M, Nishizawa M, Ota F, Sugiura W: Molecular Epidemiology of HIV-1 in Treatment Naïve Patients in North Ethiopia, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 23(4): 564-568, 2007.
- 41) Deforche K, Camacho R, Grossman Z, Silander T, Soares MA, Moreau Y, Shafer RW, Van Laethem K, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Snoeck J, Clarke J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigidio LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Shapiro JM, Katzenstein DA, Kantor R, Vandamme AM: Bayesian network analysis of resistance pathways against protease inhibitors. *Infect Genet Evol.* 7(3): 382-390, 2007.
- 42) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Notomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J: Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. *AIDS* 21: 575-582, 2007.
- 43) Takebe Y, Li S: Molecular epidemiology of HIV (Update): Understanding the genesis of global AIDS epidemic. Book Chapter for "HIV: Molecular biology and pathogenesis: viral mechanisms: 48" (Elsevier Book series), 2007.
- 44) Pereira LE, Villinger F, Onlamoon N, Bryan P, Cardona A, Pattanapanyasat K, Mori K, Hagen S, Picker L, Ansari AA: SIV infection influences the level and function of Tregs in SIV-infected rhesus macaques but not SIV-infected sooty mangabeys. *J Virol.* 81: 4445-4456, 2007.
- 45) Ansari AA, Pereira LE, Mayne AE, Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Mori K, Villinger F: The role of disease stage, plasma viral load and regulatory T cells (Tregs) on autoantibody production in SIV-infected non-human primates. *J Autoimmunity.* 28: 152-159, 2007.
- 46) Tanaka-Takahashi Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, Matano T, Mori K, Miyazawa M, Honda M, Yasutomi Y, Nagai Y, Kimura A: Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA) – based typing of multiple alleles in the rhesus macaques MHC class I Mamu-A and I Mamu-B loci. *Electrophoresis.* 28: 918-924, 2007.
- 47) Murakami T, Yamamoto N: AIDS: How do we overcome this social or biodisaster (Review)? *The Journal of Disaster Research* 2 (2): 71-80, 2007.
- 48) Ozawa S, Eda H, Ishii Y, Ban F, Funabashi T, Hata S, Hayashi K, Iga H, Ikushima T, Ishiko H, Itagaki T, Kawana R, Kobayashi S, Ogino T, Sekizawa T, Shimomura Y, Shiota H, Mori R, Nakakita T, Numazaki Y, Ozaki Y, Yamamoto S, Yoshino K, Yanagi K: The HSV-1 BgKL variant, unlike the BgOL variant, shows a higher association with orolabial infection than with infections at other sites, supporting the variant dispersion-replacement hypothesis. *J Clin Microbiol* 45: 2183-2190, 2007.
- 49) Eda H, Ozawa S, Cooperation Group for HSV-1 RFLP Variant Study, Yoshino K, Yanagi K: Contrasting geographic distribution profiles of the herpes simplex virus type 1 BgOL and BgKL variants in Japan suggest dispersion-and-replacement. *J Clin Microbiol* 45: 771-782, 2007.
- 50) Tsurutani N, Yasuda J, Yamamoto N, Choi BI, Kadoki M, Iwakura Y: Nuclear import of the preintegration complex is blocked upon infection by human immunodeficiency virus type 1 in mouse cells. *J Virol.* 81: 677-688, 2007.
- 51) Someya K, Xin KQ, Ami Y, Izumi Y, Mizuguchi H, Ohta S, Yamamoto N, Honda M, Okuda K: Chimeric adenovirus type 5/35 vector encoding SIV gag and HIV env genes affords protective immunity against the simian/human immunodeficiency virus in monkeys. *Virology.* in press.

2. 和文発表

- 1) 水谷哲夫、高橋良明、村上邦仁子、工藤知子、岩下光彦、清水正一、山本直樹: サブサハラ・アフリカ地

- 域における HIV/AIDS : 特にザンビア共和国の現状と対策 . VIRUS REPORT. 3 (1): 98-108 , 2006.
- 2) 松尾和浩、山本直樹、本多三男 : AIDS 感染予防および治療ワクチン開発の戦略 (総説) 医学のあゆみ . 218: 923-930 , 2006.
- 3) 本多三男 : 変動するエイズワクチンの開発戦略 . パイオインダストリー、12:10-17, 2006.
- 4) 杉浦 互 : 新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV-1 の動向調査 (2003 ~ 2004 年) . 病原微生物検出情報 . 27(5):119-120, 2006 .
- 5) 杉浦 互 : 薬剤耐性検査の方法と検査時期 . 治療 . 88,2006 .
- 6) 杉浦 互 : OVERSEAS (不定期連載の海外学会レポート) 第 13 回レトロウイルスと日和見感染症学会 . 30, 2006 .
- 7) 西澤雅子、柴田潤子、杉浦 互 : ウイルス感染制御における ncRNA の役割 . 実験医学 . 24(6):805-809, 2006 .
- 8) 杉浦 互 : HIV の耐性化機序 . 日本臨床 増刊 新感染症学 (上) 新時代の基礎・臨床研究 . 2006 .
- 9) 杉浦 互 : 生体防御医学辞典 . 朝倉書店 2006 .
- 5) Ueda T, Itaya M, Tusge K, Fujita K, Matsuda M, Nishizawa M, Sugiura W: Reconstruction of HIV-1 full genome clones with Bacillus subtilis. HIV Drug Resisitance Workshop. Jun 13-17, 2006, Spain.
- 6) Takebe Y: Molecular epidemiology of HIV in Asia: Understanding the genesis of Asia's expanding AIDS epidemic. Combating the "Big Three" Diseases: AIDS, Tuberculosis and Malaria, Symposium on infectious diseases, June 15, 2006, Royal Netherlands Embassy, Tokyo.
- 7) Naito Y, Takebe Y, Ui-Tei K, Saigo K: siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology/11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto, Japan.
- 8) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J: Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb), Poster, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006, Kyoto, Japan.
- 9) Miyauchi K, Curran R, Mathews E, Komano J, Murakami T, Yamamoto N, Engelman DM, Matsuda Z: Alteration of intracellular transport of the envelope protein of HIV-1 by a shift in a helical phase within its membrane-spanning domain. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006, Kyoto, Japan.
- 10) Xia X, Yu J, Zhao W, Ben K, Zhang N, Tee KK, Li X-J, Takebe Y: Unique profile of HCV genotype distribution among HIV/HCV co-infected. Injecting Drug Users in Yunnan Province, China: Identification of novel HCV genotype and implications for interrelationship with surrounding regions. 6th China-Japan Virology Congress, June 22-24, 2006, Shanghai, China.
- 11) Naito Y, Takebe Y, Ui-Tei K, Saigo K, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y: Rational design and evaluation of the effect of siRNA targeted to HIV-1 group M genomes using

学会発表

1. 国際学会

- 1) Takebe Y: Compilation of recombination breakpoints of HIV-1 chimeras comprised of CRF01_AE and subtype B/B' emerging in Asia: Biological and epidemiological implications. 13th HIV dynamics and evolution, Apr. 5-8, 2006, Woods Hole, MA, USA.
- 2) Yan H, Shiomi K, Nomura N, Chiba-Mizutani T, Miura H, Takakura T, Tanaka H, Sugiura W: New HIV-1 integrase inhibitors identified from small molecule chemical library and microbial metabolites. International Workshop on Discovery of antiviral compounds. Apr. 26-29, 2006, Lubeck, Germany.
- 3) Takebe Y: Strategic research project on AIDS and related infectious diseases in ARC, NIID (Shinjuku, Tokyo). Drug discovery and vaccine development program: Our "Seeds". 2nd eIMBL Workshop, May 20-21, 2006, Seoul, Korea.
- 4) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J: Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb). CSH Meeting on Retroviruses, May 23-27, 2006, Cold Spring Harbor, NY, USA.

- bioinformatics approach. 6th China-Japan Virology Congress, June 22-24, 2006, Shanghai, China.
- 12) Li X-J, Hoshina Y, Yokota Y, Aye KT, Thwe M, Xia X, Kusagawa S, Takebe Y: Dual infections with multiple lineages of HIV-1 strains in unique geographical recombination “hotspots” in Asia. 6th China-Japan Virology Congress, June 22-24, 2006, Shanghai, China.
- 13) Matsuo K, Okamura T, Kanekiyo M, Hattori S, Horibata S, Yamamoto N, Honda M: Humoral and cellular immune-targeted prime-boost HIV vaccine consisted of recombinant BCG and replication-defective vaccinia virus DIs. The 16th International AIDS Conference, Aug. 13-18, 2006, Toronto, Canada.
- 14) Yoshino N, Kanekiyo M, Okamura T, Hagiwara Y, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Yamamoto N, Sato S, Honda M: Replication-deficient vaccinia virus DIs recombinant as an effective and safe mucosal vaccine for immunodeficiency virus. The 16th International AIDS Conference, Aug. 13-18, 2006, Toronto, Canada.
- 15) Kanekiyo M, Ami Y, Matsuo K, Someya K, Okamura T, Suzaki Y, Yoshino N, Yamamoto N, Honda M: A low-dose codon-optimized recombinant BCG-based HIV vaccine: prime-boost vaccination with recombinant BCG and replication-defective recombinant vaccinia virus DIs evokes SIV-specific immunity which overcome the anamnestic BCG immunity in macaques. The 16th International AIDS Conference, Aug. 13-18, 2006, Toronto, Canada.
- 16) Tee KK, Li X-J, Nohtomi K, Ng KP, Kamarulzaman A, Takebe Y: Identification of a Novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Malaysia. XVI IAC, Aug. 13-18, 2006, Toronto, Canada.
- 17) Ryo A, Tsurutani N, Morikawa Y, Yamamoto N: Identification and characterization of a novel host factor that regulates the microtubule-dependent transport of HIV-1 Gag. 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 3-7, 2006, Awaji, Japan.
- 18) Komano J: Characterization of neutralizing antibodies found in long-term non-progressors of Japanese hemophiliacs. 3rd Taiwan-Japan Symposium on HIV/AIDS. Sept. 7-8, 2006, Taipei, Taiwan, R.O.C.
- 19) Mori K: What is the mechanism of pathogenicity of HIV/SIV determined by glycosylation of Env? : Study on immunological properties of a novel attenuated deglycosylation mutant that elicits protective immune responses in monkey AIDS model, 3rd Taiwan-Japan Symposium on HIV/AIDS, Sept. 7-8, 2006, Taipei, Taiwan.
- 20) Yamamoto N: Hematopoietic Stem Cell-Engrafted NOD/SCID/IL2R γ ^{null} Mice Develop Human Lymphoid System and Induce Long-Lasting HIV-1 Infection with Specific Humoral Immune Responses. Taiwan-Japan Symposium on HIV/AIDS. Sept. 7-8, 2006, Taipei, Taiwan.
- 21) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J: Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of CDK9/Cyclin T complex (P-TEFb). 7th AIDS Seminar in Kumamoto, Sept. 21-22, 2006, Kumamoto, Japan.
- 22) Nakasone T, Kanekiyo M, Yoshino N, Ami Y, Yamamoto N: Cell-Associated SHIV Infection to Cynomolgus Monkeys. 24th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 4-7, 2006, Atlanta, USA.
- 23) Sugimoto C, Ono F, Nakamura S, Izumo S, Yamamoto N, Nagai Y, Suzuki Y, Mori K: Clues for the attenuation of deglycosylated mutant of SIV239 in the primary infection. 24th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. Oct. 4-7, 2006, Atlanta, USA.
- 24) Mori K, Sugimoto C, Ono F, Nakamura S, Nagai Y, Suzuki Y, Villinger F, Ansari A, Yamamoto N: Suppression of SIV239 challenge infection in the animals controlling pre-existing SIV infections with attenuated viruses or pathogenic viruses. 24th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. Oct. 4-7, 2006, Atlanta, USA.
- 25) Honda M, Matsuo K, Kanekiyo M, Yamamoto N, Nabel GJ: A *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin vector vaccine elicits immunity to HIV-1 Env and tuberculosis. VRC Scientific Training Retreat, Oct. 18-20, 2006, Philadelphia, USA.
- 26) Matsuo K, Okamura T, Kanekiyo M, Horibata S, Hattori S, Yamamoto N, Nabel GJ, Honda M: *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin vector-based prime/boost vaccine expressing modified human immunodeficiency virus type 1 Envelope. VRC Scientific Training Retreat, Oct. 18-20, 2006, Philadelphia, USA.
- 27) Kanekiyo M, Matsuo K, Hamatake M, Matsumoto S, Yamada T, Ami Y, Someya K, Suzaki Y, Yoshino N,

- Yamamoto N, Honda M: Codon optimization of HIV/SIV genes in recombinant BCG for HIV vaccine development. VRC Scientific Training Retreat, Oct. 18-20, 2006, Philadelphia, USA.
- 28) Bandaranayake RM, Prabu-Jeyabalan M, Kakizawa J, Sugiura W, Shiffer C: Structural Analysis of HIV-1 CRF01_{pro} Protease in Complex with the Substrate p1-p6. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov.12-15, 2006, Virginia, USA.
- 29) Shibata J, Nishizawa M, Matsuda M, Sugiura W, Ren F, Tanaka H: Analysis of Co-Evolution Between Mutations in Protease Inhibitor Resistance and in Gag. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov.12-15, 2006, Virginia, USA.
- 30) Takebe Y, Telesnitsky A: Role of recombination-Driven human sequence transduction on the genesis of multiple-drug resistant mutant identified in Japan. 7th Symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov. 12-15, 2006, Chantilly, Virginia, USA.
- 31) Komano J, Futahashi Y, Isogai M, Hamatake M, Matsuda Z, Shiino T, Takebe Y, Sato H, Yamamoto N: Drug resistance mutations in the polymerase catalytic domain negatively affect the RNase H activity of HIV-1 reverse transcriptase. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov 12-15, 2006, Chantilly VA, USA.
- 32) Murakami T, Yasutomi E, Ablan S, Miyakawa K, Komano J, Matsuda Z, Freed EO, Yamamoto N: Detailed analyses of HIV-1 matrix mutants: Effects on an early stage of infection. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov. 12-15,2006, Chantilly VA, USA.
- 33) Yamamoto N: Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R γ null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. 2nd German-Japanese HIV Symposium, Nov. 24, 2006, Bochum, Germany.
- 34) Takebe Y, Sato H, Shiino T, Telesnitsky A: High level of plasticity and flexibility of HIV-1: Detection of unusual case of human sequence transduction. US-Japan Cooperative Medical Science Program: 19th Joint Meeting of the AIDS Panels, Dec. 6-7, 2006, Kagoshima, Japan.
- 35) Komano J: Broadly reactive strong neutralizing antibody against HIV-1 in long-term survivors of HIV-1-infected haemophiliacs. The US-Japan Cooperative Medical Science Program 19th Joint Meeting of AIDS Panel. Dec. 6-7, 2006, Kagoshima, Japan.
- 36) Yamamoto N, Honda M: Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R γ null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 19th Joint Meeting of the AIDS Panels, Dec. 6-7, 2006, Kagoshima, Japan.
- 37) Sugiura W: Drug Resistance assays. International Conference on Molecular and Cellular Biology of Therapeutics of HIV and Associated Viral Infections. Jan.12-14, 2007, Hyderabad, India.
- 38) Komano J et al: Broadly reactive strong neutralizing antibody against HIV-1 in long-term survivors of HIV-1-infected haemophiliacs. Keystone symposia, HIV vaccine and molecular and cellular determinants of HIV pathogenesis. Mar. 25-30, 2007, Whistler, British Columbia, Canada.

2. 国内学会

- 1) Hua Yan, Nobuhiko Nomura, Tomoko Chiba-Mizutani, Hideka Miura, Tadakazu Takakura, Satoshi Takeda, Wataru Sugiura: New HIV-1 integrase inhibitors identified from small molecule chemical library. 第 16 回抗ウイルス化学療法研究会. 2006 年 5 月 26-27 日, 福島.
- 2) 吉野直人、兼清優、萩原由加利、染谷健二、松尾和浩、網 康至、佐藤成大、山本直樹、本多三男: リコンビナント DIs ワクチンによる粘膜免疫誘導. 第 4 回岩手医科大学先端医療研究センター公開シンポジウム、2006 年 7 月 26 日、盛岡市.
- 3) 岩谷靖雅、レビンジュディス、杉浦 互: APOBEC3G の HIV-1 の逆転写阻害メカニズム. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月 19 日~21 日、名古屋市.
- 4) 三浦秀佳、千葉智子、滝澤万里、松田昌和、西澤雅子、本多三男、杉浦 互: ヒト細胞由来レポーター細胞 MARRBLE を用いた臨床分離株薬剤感受性検査の評価、第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月 19 日~21 日、名古屋市.
- 5) 柴田潤子、西澤雅子、松田昌和、長谷川直紀、吉田いづみ、杉浦 互、任 鳳蓉、田中 博: 抗 HIV 剤治療下における Protease と Gag の相互干渉と共進化に関する解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、

- 2006年11月19日～21日、名古屋市。
- 6) 草川茂、武部豊：HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの構築とそのウイルス学的性質の解析、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19日～21日、名古屋市。
 - 7) 徳永研三、木ノ本正信、坂本優子、巽 正志、志村まり、石坂幸人、倉田 毅、佐多徹太郎：宿主因子APOBEC3Gに対するHIV-1 Vifの抑制活性の多様性、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19日～21日、名古屋市。
 - 8) 青木徹、貝の瀬由成、二橋悠子、清水佐紀、松田善衛、山本直樹、駒野 淳：HIV-1 GagN末端のミリスチン酸化非依存的な分子集合・出芽およびVLPの性質に関する解析、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19日～21日、名古屋市。
 - 9) 濱武牧子、浦野恵美子、花房忠次、加藤真吾、Tee Kok Keng、武部 豊、山本直樹、駒野 淳：AIDS長期未発症のHIV感染血友病患者における高力価中和抗体の存在とその病期進行への寄与に関する解析、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19日～21日、名古屋市。
 - 10) 駒野 淳、二橋悠子、磯貝まや、濱武牧子、松田善衛、佐藤裕徳、椎野貞一郎、武部 豊、山本直樹：挿入変異を伴う多剤耐性 HIV-1(CRF01_AE)における薬剤耐性亢進のメカニズム—薬剤耐性獲得におけるRNase H活性の関与、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19日～21日、名古屋市。
 - 11) 駒野淳、姉崎裕介、二橋悠子、磯貝まや、藤 義秀、星野忠次、武部 豊、山本直樹：HIV-1の逆転写酵素が持つRNase H活性に対する特異的阻害剤の開発、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19日～21日、名古屋市。
 - 12) 篠田知宏、村上 努、安富英理子、真鍋美奈子、宮内浩典、駒野 淳、松田善衛、山本直樹：感染前期過程に欠損を有する変異株を用いたHIV-1マトリックス蛋白質結合宿主因子の探索、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19日～21日、名古屋市。
 - 13) 小池 満、三好 洋、山口洋子、奥瀬千晃、中島由紀子、井上靖之、鈴木貴雄、高橋正知、三浦偉久男、杉浦 互、中島秀喜：HIV/HIB 重複感染例の検討、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日～12月2日、東京。
 - 14) 古賀一郎、小田原 隆、松田昌和、杉浦 互、後藤美江子、中村哲也、岩本愛吉：良好なHIV治療中に合併した梅毒感染前後でのHIVプロウイルス塩基配列の変化、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日～12月2日、東京。
 - 15) 大出裕高、松山 翔、柿澤淳子、杉浦 互、星野忠次：CRF01_AE HIV-1におけるNFV耐性変異N88Sの出現メカニズムに関する構造学的知見、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日～12月2日、東京。
 - 16) 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、浅黄 司、吉田繁、正兼亜季、大家正泰、渡邊香奈子、湯永博之、松田昌和、貞升健志、岡田清美、近藤真規子、奏 眞美、溝上泰司、森 治代、南 留美、杉浦 互、金田次弘：HIV-1遺伝子型薬剤耐性検査のバリデーション、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日～12月2日、東京。
 - 17) 西澤雅子、加藤真吾、三浦秀佳、山本直樹、杉浦 互：細胞内における抗HIV薬(プロテアーゼ阻害剤)の薬剤濃度のモニタリング、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日～12月2日、東京。
 - 18) 草川茂、武部豊：HIV-1サブタイプB'感染性分子クローンの樹立とその性状の解析、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日～12月2日、東京。
 - 19) 村上 努、大隈 和、熊倉 成、田中礼子、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹：新規CXCR4アンタゴニストKRH-3166は経口利用可能な高活性HIV-1剤である、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日～12月2日、東京。
 - 20) 杉本智恵、中山英美、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森 一泰：新規糖鎖欠損SIVの性質とアカゲザルでの感染、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日～12月2日、東京。
 - 21) 森 一泰：Immune correlates: Lessons from a novel attenuated mutant virus、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日～12月2日、東京。
 - 22) Komano J：Myristoylation independent assembly, transport, and VLP formation of HIV-1 Gag、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日～12月2日、東京。
 - 23) 駒野 淳、姉崎裕介、二橋悠子、磯貝まや、武部豊、山本直樹：HIV-1の逆転写酵素に内在するRNase H活性阻害薬の開発(1)—小分子化合物ライブラリーからのスクリーニング、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日～12月2日、東京。
 - 24) 濱武牧子、浦野恵美子、花房忠次、加藤真吾、Tee Kok Keng、武部豊、山本直樹、駒野 淳：血友病患者に

おけるエイズ長期未発症症例における高力価中和抗体の存在と標的部位の同定、第 20 回日本エイズ学会学術集会、2006 年 11 月 30 日～12 月 2 日、東京。

- 25) 駒野淳、二橋悠子、磯貝まや、濱武牧子、松田善衛、佐藤裕徳、椎野貞一郎、武部 豊、山本直樹：HIV-1 逆転写酵素 polymerase active site への薬剤耐性変異が誘導する RNase H 活性の低下と耐性亢進への寄与、第 20 回日本エイズ学会学術集会、2006 年 11 月 30 日～12 月 2 日、東京。
- 26) Takebe Y, Sato H, Shiino T, Telesnitsky A: Role of recombination-driven human sequence transduction on the genesis of multiple-drug resistant mutant identified in Japan. 第 6 回分子環境予防医学研究会、2006 年 12 月 1-2 日、京都。
- 27) 堀端重男、網 康至、大谷克城、坂本隆志、岸雄一郎、木佐木博、鈴木定彦、駒野 淳、山本直樹、若宮伸隆、本多三男：ヒト PBMC 移植 NOD/SCID マウスを用いた *in vivo* におけるマンノースバインディングレクチンの抗 HIV 活性の評価、第 36 回日本免疫学会学術集会、2006 年 12 月 11-13 日、大阪。
- 28) 駒野 淳：HIV-1 複製制御の分子メカニズムとエイズ治療法への展望、造血幹細胞移植と感染症対策、2007 年 2 月 3 日、東京。
- 29) 岡村智崇、松尾和浩、志田壽利、山本直樹、本多三男、長谷川篤彦：高発現型ワクシニア合成 Promoter を用いた高度弱毒化ワクシニアウイルス DIs の至適化、日仏獣医学会総会・第 36 回研究例会、2007 年 3 月 1 日、東京。